

MSc

2.º
CICLO

FCUP
2018

U. PORTO

Caracterização de membranas modelo por DSC e estudo
da partição de drogas para membranas por ITC

Inês Oliveira Martins

FC

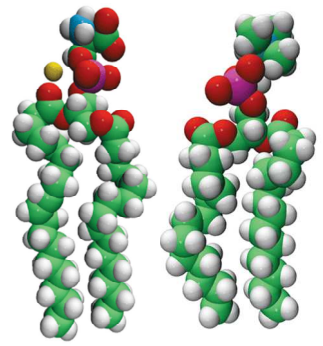
U. PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO
FC

Caracterização de membranas modelo por DSC e estudo da partição de drogas para membranas por ITC

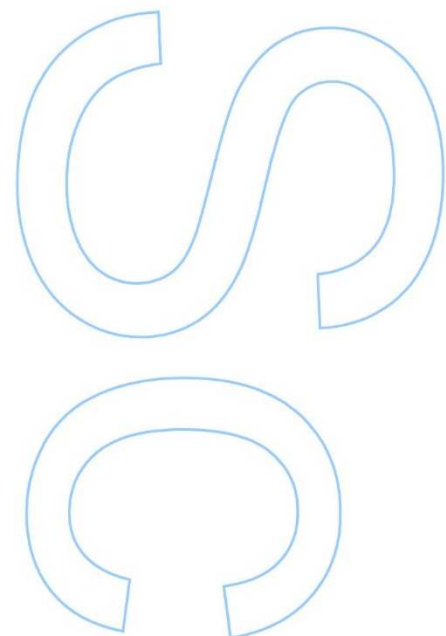
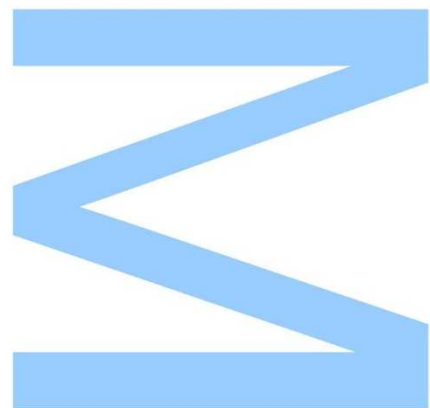
Inês Oliveira Martins

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Química
2018

U. PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO
FC



Caracterização de membranas modelo por DSC e estudo da partição de drogas para membranas por ITC



Inês Oliveira Martins

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

2018

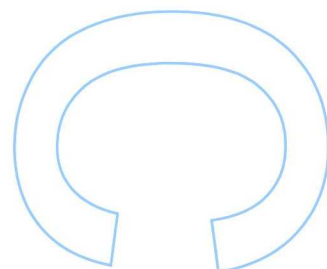
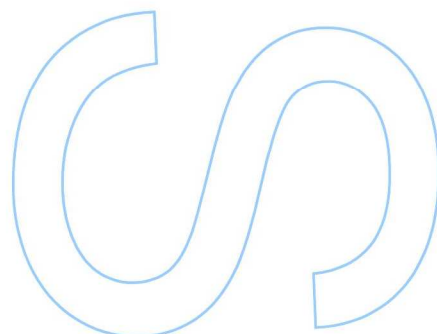
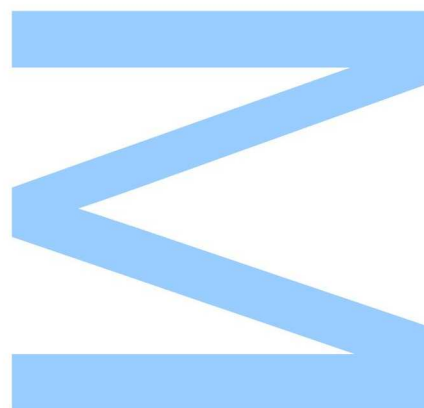
Orientador

Margarida Bastos, Professora Associada,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Resumo

Muitos fármacos não são reconhecidos por transportadores ativos, por isso a permeação passiva através da membrana é um caminho importante. Assim, o estudo da sua partição para membranas é fundamental na caracterização das suas propriedades. As membranas modelo fornecem um modelo simples das membranas biológicas, em que é possível controlar as suas propriedades e modelar a sua composição como desejado. O uso de membranas modelo com uma composição apropriada é um excelente método para avaliar a permeação passiva.

Neste trabalho foi feita a caracterização da transição de fase de membranas modelo e estudos de partição de um fármaco conhecido para estas membranas. Como membranas modelo foi usado o DMPC e misturas binárias de DMPC e POPS nas proporções de (8:2) e (9:1). O fármaco usado foi a clorpromazina (CPZ).

Como técnicas experimentais principais foram utilizadas a calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e a calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A caracterização do comportamento físico dos lipossomas foi feita através da calorimetria diferencial de varrimento, que também permitiu avaliar o efeito da CPZ nas diferentes membranas lipídicas usadas. A calorimetria de titulação isotérmica foi usada para obter os parâmetros termodinâmicos associados à partição para as membranas, a constante de partição, K_p , e a variação de entalpia associada, ΔH . Os ensaios de ITC foram realizados a 37 °C.

Neste estudo foi também usada a espectroscopia de UV-vis para estudo da transição de fase gel-cristal líquido dos lipossomas unilamelares, com o intuito de estabelecer um método alternativo para a determinação da temperatura de transição das membranas lipídicas, tomando partido da diferença na dispersão de luz observada quando os lipossomas estão na fase gel ou cristal líquido.

Palavras chave: Biomembranas, Lípidos, Calorimetria Diferencial de Varrimento, Calorimetria de Titulação Isotérmica, Clorpromazina, Partição, Lipossomas, Variação de entalpia, Transições de fase, DMPC, POPS

Abstract

Many drugs are not recognized by active transporters and thus passive permeation through the membrane is a significant route. Therefore, the study of their partition to membranes is fundamental for the characterization of their properties. Model membranes provide a simple model of biological membranes, where we can control their properties and modulate their composition as needed. The use of model membranes of appropriate composition is an excellent experimental method to evaluate passive permeation.

In present work we did characterize the phase transitions of model membranes and performed partition studies of a well-known drug to these membranes. We used model membranes of DMPC and binary mixtures of DMPC with at 8:2 and 9:1 ratios. The drug used was chlorpromazine (CPZ).

The main experimental techniques used were differential scanning calorimetry, DSC, and isothermal titration calorimetry, ITC. The characterization of the liposomes' phase transitions was carried out by DSC. This technique was also used to characterize the effect of CPZ on the various model membrane studied. ITC was used to follow the partition of CPZ to the membranes and obtain the corresponding thermodynamic parameters, K_p and ΔH . The ITC experiments were performed at 37 °C.

UV-vis experiments were made in order to develop a protocol for determination of the gel to liquid crystalline phase transition temperature of unilamellar liposomes. For this the difference in optical dispersion that is observed between the gel and liquid crystalline phases was used.

Key words: Biomembranes, Lipids, Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry, Chlorpromazine, Partition, Liposomes, Enthalpy Variation, Phase Transitions, DMPC, POPS

Índice

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Índice	III
Índice de tabelas.....	V
Índice de figuras	VI
Lista de abreviaturas.....	VIII
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Membrana Biológica.....	1
1.1. Lípidos na membrana.....	2
1.2. Bicamada lipídica	3
1.3. Lipossomas	4
1.3.1. Tipos de lipossomas	5
1.3.2. Métodos de preparação	6
i. Hidratação do filme lipídico.....	6
ii. Hidratação direta	7
iii. Extrusão.....	7
1.4. Transições de fase.....	8
2. Interação com as membranas.....	9
2.1. Clorpromazina- CPZ	9
2.2. Partição simples	10
2.3. Outros modelos de partição	10
2.3.1. Efeitos de carga na superfície das membranas	11
2.3.2. Teoria de Gouy-Chapman-Stern	11
3. Calorimetria.....	15
3.1. DSC- Calorimetria diferencial de varrimento	16
3.2. ITC- Calorimetria isotérmica de titulação	18
4. Espectroscopia Ultravioleta-visível UV-Vis	20
PARTE EXPERIMENTAL.....	21
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
1. Materiais e métodos.....	21
1.1. Reagentes	21
1.2. Preparação dos lipossomas e quantificação lipídica.....	21

1.2.1. Preparação tampão HEPES	21
1.2.2. Preparação dos lipossomas	22
1.2.3. Determinação do tamanho dos Lipossomas por DLS	24
1.2.4. Quantificação dos fosfolípidos	24
1.3. Preparação da solução de CPZ	25
2. Técnicas experimentais	26
2.1. Calorimetria diferencial de varrimento, DSC	26
2.1.1. Procedimento	26
2.1.2. Tratamento de resultados	27
2.2. Calorimetria de titulação isotérmica, ITC	28
2.2.1. Procedimento	28
2.2.2. Tratamento de resultados	29
2.3. Espectroscopia de Ultravioleta Visível UV-Vis	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
1. Tamanho dos lipossomas	35
2. Calorimetria diferencial de varrimento	36
2.1. Caracterização dos lipossomas por DSC	36
2.1.1. Lipossomas de DMPC e POPS	36
2.1.2. Lipossomas de DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS(9:1)	37
2.2. Efeito da CPZ nas membranas	38
2.2.1. Sistema lipídico: DMPC	38
2.2.2. Sistema lipídico: DMPC:POPS (8:2)	39
2.2.3. Sistema lipídico: DMPC:POPS (9:1)	40
3. Calorimetria de titulação isotérmica	42
3.1. Partição da CPZ para as membranas	42
3.1.1. Sistemas lipídicos : DMPC e DMPC:POPS(9:1)	42
4. Espectroscopia de Ultravioleta Visível UV-VIS	47
4.1. Experiências com DMPC	48
4.2. Experiências com DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1)	50
CONCLUSÃO	53
IV. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
V. REFERÊNCIAS	55

Índice de tabelas

Tabela 1. Estrutura química de diferentes glicerofosfolípidos	3
Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos obtidos para os sistemas lipídicos puros	37
Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos obtidos para os sistemas binários DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1)	38
Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos obtidos no estudo do efeito da CPZ nas membranas de DMPC	39
Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos obtidos no estudo do efeito da CPZ nas membranas de DMPC:POPS (8:2)	40
Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos obtidos no estudo do efeito da CPZ nas membranas de DMPC:POPS (9:1)	41
Tabela 7. Valores médios e respetivo desvio padrão da constante de partição e respetiva variação de entalpia de partição que foram obtidos usando o modelo de partição simples e partição com correção dos efeitos eletrostáticos para a partição de CPZ nas diferentes membranas estudadas, considerando só o folheto externo ($\gamma = 0,5$) e todo o lípido presente ($\gamma = 1$)	45
Tabela 8. Valores de literatura obtidos usando o modelo de partição simples e partição com correção dos efeitos eletrostáticos para a partição de CPZ em membranas de POPC e POPC:POPS(8:2).....	46
Tabela 9. . Resultados da calibração das temperaturas usadas para o DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1)	47
Tabela 10. Valores obtidos para as temperaturas de transição (T_m) do DMPC	50
Tabela 11. Valores obtidos para as temperaturas de transição (T_m) do DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1)	51

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura da Membrana segundo o modelo do mosaico fluido.....	1
Figura 2. Diferentes tipos de agregação: E - Bicamada, F- lipossoma, G-cúbica contínua, H _I - hexagonal, H _{II} - hexagonal invertida, I - cúbica micelar ^[7]	4
Figura 3. Estrutura química do 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) e o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS).....	5
Figura 4. Classificação de lipossomas quanto ao tamanho e número de bicamadas.....	6
Figura 5. Esquema da preparação da suspensão de vesículas multilamelares (MLVs) ^[13]	6
Figura 6. Extrusor macro (a), componentes do extrusor micro de “seringas” (b) e extrusor montado (c).....	7
Figura 7. Transições na fase lamelar ^[16]	8
Figura 8. Estrutura química da Clorpromazina (CPZ).....	9
Figura 9. Exemplo esquemático de partição de um soluto para membrana.....	10
Figura 10. Representação esquemática das cargas e dos potenciais numa interface carregada positivamente Ψ_o - potencial na superfície; Ψ_δ - potencial de Stern; δ - espessura da camada de Stern; $1/k$ - comprimento de Debye (distancia onde ocorre a separação de cargas) ^[26]	12
Figura 11. Os instrumentos de DSC usados, da Microcal/Malvern: (a) PEAQDSC; (b) VP-DSC e (c) Representação esquemática do interior do calorímetro, com células de amostra e referência.....	17
Figura 12. Representação esquemática do interior do VP-ITC (Microcal/Malvern).....	19
Figura 13. Montagem do evaporador rotativo utilizado.....	22
Figura 14. Esquema de montagem para a extrusão (a), extrusor portátil (b).....	23
Figura 15. Curva de correlação em função do tempo e distribuição de tamanhos das vesículas.....	24
Figura 16. Reações envolvidas no método de quantificação.....	25
Figura 17. Setup VP-DSC.....	26
Figura 18. Curva típica obtida por DSC.....	28
Figura 19. Setup VP- ITC (a) e detalhe da seringa de titulação (b).....	29
Figura 20. Termograma típico das experiências de titulação realizadas (esquerda) e representação gráfica do calor por injeção em função da razão molar [lip]/[CPZ].....	30
Figura 21. Células usadas (a), Setup usado nas calibrações de temperatura (b).....	33
Figura 22. Resultados obtidos para a distribuição de tamanhos.....	35
Figura 23. Termograma da transição gel-cristal líquido de LUVs de DMPC e MLVs de POPS.....	36
Figura 24. Termograma da transição gel-cristal líquido de LUVs de DMPC: POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1) em tampão Hepes.....	37
Figura 25. Termograma da transição gel-cristal líquido de LUVs DMPC na presença de diferentes proporções de CPZ.....	38
Figura 26. Termograma da transição gel-cristal líquido de LUVs DMPC:POPS(8:2) na presença de diferentes proporções de CPZ.....	39
Figura 27. Termograma da transição gel-cristal líquido de LUVs DMPC:POPS(9:1) na presença de diferentes proporções de CPZ.....	40
Figura 28. Termograma (esquerda) e correspondentes valores da variação de entalpia por injeção, relativos à titulação de CPZ com DMPC a 37 °C.....	43
Figura 29. Gráfico da sobreposição das integrações feitas para o calor obtido nos ensaios usando DMPC e DMPC:POPS (9:1).....	43
Figura 30. Representação gráfica da variação de entalpia por injeção em função do número da injeção para os ensaios de titulação de CPZ com DMPC com a curva calculada obtida considerando o modelo de partição simples, para $\gamma=0,5$ (esquerda) e $\gamma=1$ (direita).....	44
Figura 31. Gráficos do calor envolvido em cada injeção considerando o modelo de partição com correção dos efeitos eletrostáticos.....	44
Figura 32. Espectro do DMPC célula Y(220-400nm).....	49
Figura 33. Curva de OD em função da temperatura.....	49

Figura 34. Representação gráfica da primeira e segundas derivadas da curva ajustada.....	50
Figura 35.Espetro do DMPC:POPS (9:1) usando a célula Y negra(220-400nm).....	51
Figura 36. Curva de OD em função da temperatura (A) e gráfico das derivadas para o sistema DMPC:POPS (9:1)(B).....	51

Lista de abreviaturas

PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PS	Fosfatidilserina
PG	Fosfatidilglicerol
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPS	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina
DMPE	1,2-ditetradecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)
MLVs	Vesículas multilamelares (multilamellar vesicles)
LUVs	Vesículas unilamelares grandes (large unilamellar vesicles)
SUVs	Vesículas unilamelares pequenas (small unilamellar vesicles)
CPZ	Clorpromazina
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
HEPES	Ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
DLS	Dispersão dinâmica de luz (Dynamic light scattering)

Lista de símbolos

$L_{\beta'}$	Fase gel plana
$P_{\beta'}$	Fase gel ondulada
L_{α}	Fase lamelar
K_p	Coeficiente de partição
C_1	Concentração da espécie na fase aquosa
C_2	Concentração da espécie na membrana
σ	Densidade superficial de carga
Ψ	Potencial de superfície
Ψ_0	Potencial na superfície da membrana
c	Concentração do eletrólito na solução
Ψ_{δ}	Potencial de Stern
δ	Espessura da camada de Stern
$1/k$	Comprimento de Debye
ϵ_r	Constante dielétrica relativa
ϵ_0	Constante dielétrica do vazio
$c_{i,sup}$	Concentração da espécie carregada na superfície da membrana
$c_{i,aq}$	Concentração da espécie carregada na solução aquosa
z_i	Valência das espécies carregadas
T	Temperatura absoluta
F	Constante de Faraday
R	Constante dos gases ideais
Ψ_x	Potencial medido a uma distância x da membrana
ζ	Potencial zeta
c_i	Concentração dos iões na solução

p	Pressão
T_m	Temperatura de transição de fase
ΔH	Variação de entalpia
φ	Fluxo de calor
β	Velocidade de aquecimento
C_p	Capacidade calorífica
Q	Calor envolvido no processo
t	Tempo
K	Constante de equilíbrio
N	Estequiometria da interação
ΔG	Variação de energia de Gibbs
ΔS	Variação de entropia
P_0	Radiação luz monocromática
P	Luz irradiada
l	Comprimento da célula
T	Transmitância
A	Absorvância
OD	Dispersão ótica
c	Concentração
ε	Absortividade molar ou coeficiente de extinção molar
D	Coeficiente de difusão translacional
$r(H)$	Raio hidrodinâmico
k	Constante de Boltzman
η	Viscosidade
$V(i)$	Volume de injeção
V_{Cell}	Volume da célula,

q_{dil}	Calor de diluição
$n_{CPZL(i)}$	Número de moles de CPZ na fase lipídica após cada injeção
CPZ_L	Número de moles de CPZ na fase lipídica
CPZ_W	Número de moles de CPZ na fase aquosa
K_P^{obs}	Coeficiente de partição observado
n_{CPZ_T}	Número total de moles de CPZ
n_{CPZ_W}	Número de moles de CPZ na fase aquosa
n_{CPZ_L}	Número de moles de CPZ na fase lipídica
V_T	Volume total
V_W	Volume molar da fase aquosa
V_L	Volume molar da fase lipídica
[L]	Concentração de lípido na célula

INTRODUÇÃO

-
1. Membrana biológica
 2. Interação com membranas
 3. Calorimetria
 4. Espectroscopia Ultravioleta Visível

I. INTRODUÇÃO

1. Membrana Biológica

As membranas biológicas têm um papel fundamental na estrutura e na função de células procarióticas e eucarióticas, em animais e vegetais. São estruturas organizadas, constituídas primordialmente por lípidos, proteínas e pequenas quantidades de hidratos de carbono. A sua principal função é delimitar diferentes compartimentos biológicos, como células e organelos celulares, funcionando como uma barreira física com permeabilidade baixa e específica que fornece transporte direcional de espécies para dentro e para fora da célula. ^[1,2] É através da membrana que ocorrem diversos processos necessários ao bom desempenho e desenvolvimento celular, como o transporte, crescimento, resposta imunológica, atividade enzimática. ^[2]

Durante a década de 60 foram propostos muitos modelos alternativos para a membrana biológica, mas de todos os modelos sugeridos o modelo que ainda hoje é referido, e ainda considerado como contendo os aspetos mais relevantes da membrana biológica é o modelo do Mosaico Fluido (figura 1), proposto em 1972 por *Singer* e *Nicolson*. ^[3]

Segundo os autores, os fosfolípidos estão organizados como uma bicamada fluída descontínua, apesar de haver pequenas frações que interagem com as proteínas da membrana. Este modelo, modelo do mosaico fluido, define a membrana como uma 'solução viscosa', orientada e bidimensional, de lípidos e proteínas anfipáticas em equilíbrio termodinâmico. ^[3,4] De acordo com este modelo, algumas das proteínas estão mergulhadas na bicamada lipídica enquanto que outras estão apenas associadas à superfície da membrana e distribuídas assimetricamente pela membrana.

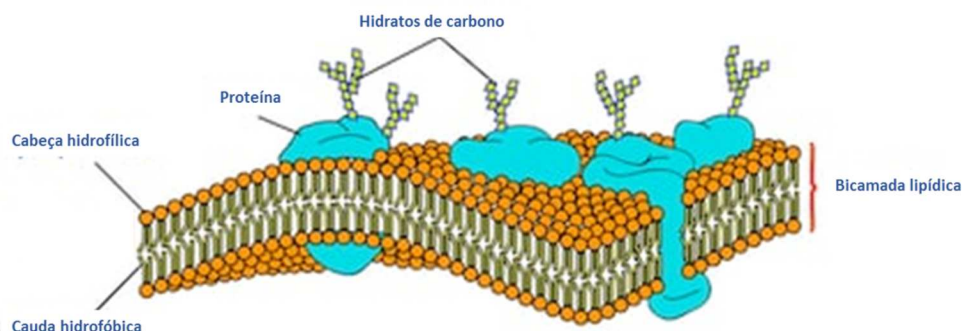


Figura 1. Estrutura da Membrana segundo o modelo do mosaico fluido

Este foi o primeiro modelo a reconhecer a membrana plasmática como dinâmica, fluída e em constante alteração. Ao longo do tempo, algumas correções e aperfeiçoamentos foram feitos, como por exemplo o facto de existir uma densidade de proteínas na superfície da membrana muito maior do que a considerada pelo modelo de *Singer e Nicolson* ^[3,5]. Uma extensão deste modelo foi feita por *Simons e Ikonen* ^[6], que introduziram o conceito de jangadas lipídicas, atualmente definidas como domínios lipídicos heterogéneos, muito dinâmicos, ricos em colesterol e esfingolípido.

Apesar da diversidade de células presentes nos seres vivos, a bicamada lipídica é a unidade básica estrutural das membranas biológicas. ^[1]

1.1. Lípidos na membrana

Os lípidos, são ésteres formados a partir da reação de um ácido gordo e um álcool sendo também conhecidos como ‘gorduras’. São uma fonte de energia vital para o organismo, além de possuírem funções estruturais, hormonais, impermeabilizantes entre muitas outras. São insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos como por exemplo álcoois ou clorofórmio. Os lípidos são moléculas anfifílicas constituídas por uma região polar vulgarmente chamada cabeça e por uma região apolar, conhecida por cauda. A cabeça é constituída por grupos iónicos, zwitteriónicos ou polares (zonas hidrofílicas) e a cauda por cadeias de hidrocarbonetos lineares ou ramificados com mais de 8 grupos metileno (zonas hidrofóbicas).^[7-10] Apresentam uma estrutura geral constituída por uma longa cadeia carbonada na qual estão associados grupos como mono e diacilgliceróis, açúcares, fosfato, grupos carboxilo, amino ou álcool. Os grupos que se associam a essa longa cadeia, podem ser alterados aumentando assim a diversidade de lípidos nas células eucarióticas.

Apesar de haver uma grande variedade de lípidos, os que fazem parte das membranas biológicas, podem dividir-se em três grupos - os glicerolípido, os esfingolípido e os esteróis. O grupo dos glicerolípido é constituído por todos os lípidos que contêm glicerol e são compostos por mono, di e tri-acilgliceróis substituídos, com cadeias saturadas e insaturadas. Neste grupo de lípidos estão incluídos os glicerofosfolípido e os glicoglicerofosfolípido. Os glicerofosfolípido mais conhecidos como fosfolípido, derivam do fosfato de glicerol e são os principais elementos estruturais das membranas biológicas.

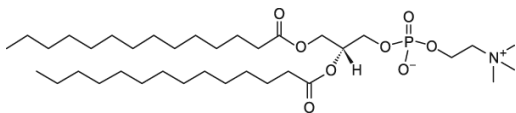
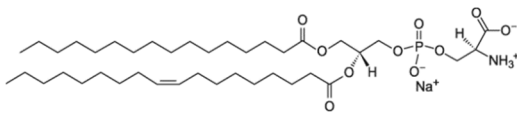
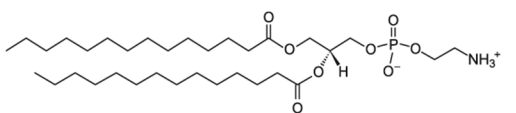
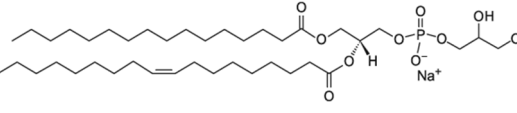
Nas membranas biológicas é possível encontrar o ácido fosfatídico (PA) a fosfatidilcolina (PC), a fosfatidiletanolamina (PE), a fosfatidilserina (PS) e o fosfatidilglicerol (PG).

Dependendo da carga do grupo polar, os glicerofosfolípidos podem ser zwitteriônicos ou carregados negativamente para valores de pH fisiológico. Os zwitteriônicos comuns são os PC e PE e os PG, PA, e PS são aniônicos.^[1] Nos glicoglicerofosfolípidos, o grupo fosfato encontra-se ligado a uma molécula de açúcar. Estes lípidos contêm açúcares como glucose, galactose e outros com diferentes ligações glicosídicas na sua cabeça polar, podendo ser encontrados nas membranas de diferentes bactérias.

Os esfingolípidos diferem dos glicerofosfolípidos pois possuem uma ceramida como unidade estrutural fundamental.

Por último, outro tipo de lípidos que se podem encontrar nas membranas biológicas, são os esteróis. O colesterol é o esteroide mais importante que está presente nas membranas biológicas de eucariotas.

Tabela 1. Estrutura química de diferentes glicerofosfolípidos

Zwitteriônicos	Aniônicos
 DMPC	 POPS
 DMPE	 POPG

1.2. Bicamada lipídica

A base das membranas biológicas é a bicamada lipídica.

As bicamadas lipídicas podem também ser produzidas em laboratório, organizando-se de uma forma esférica formando vesículas, conhecidas como lipossomas. No entanto, esta não é a única forma possível de organização - as propriedades geométricas das moléculas lipídicas fazem com que se auto-agreguem

espontaneamente em dupla camada, aberta ou fechada ou outras formas de agregação mais complexas. Devido à natureza anfipática das moléculas lipídicas, as membranas podem assumir distintas estruturas, em bicamadas (abertas ou em lipossomas - vesículas com interior aquoso), fases hexagonais (normais ou invertidas) e fases cúbicas.

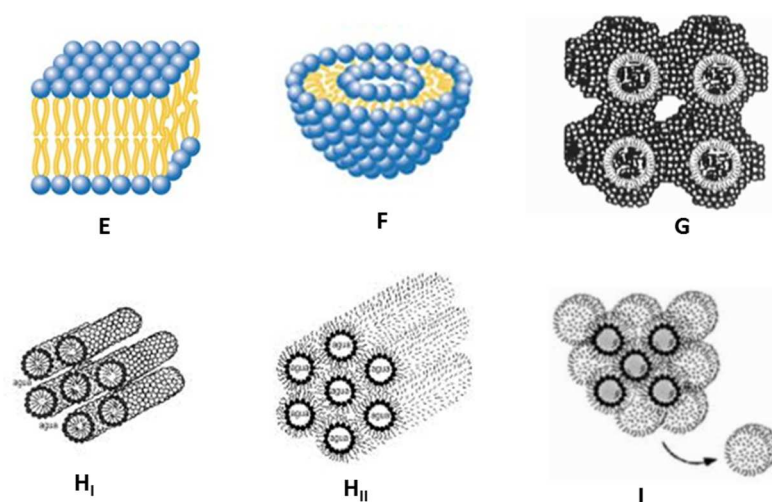


Figura 2. Diferentes tipos de agregação: E - Bicamada, F- lipossoma, G-cúbica contínua, H_I - hexagonal, H_{II} - hexagonal invertida, I - cúbica micelar ^[7]

1.3. Lipossomas

Os lipossomas são constituídos por uma ou várias bicamadas fosfolipídicas distribuídas em torno de um compartimento aquoso, formando uma vesícula esférica, em que a parte hidrofílica, também conhecida por cabeça fica em contacto com o compartimento aquoso e externamente com a solução, e a parte hidrofóbica, conhecida por cauda fica orientada para dentro. ^[11,12]

Devido ao seu caráter anfifílico, à sua estrutura, composição química e suas propriedades coloidais, os lipossomas apresentam características úteis em várias aplicações. Interagem com as membranas biológicas e células, podendo ser aplicados na medicina, na indústria farmacêutica, cosmética, sendo usados como transportadores/libertadores de drogas no organismo. ^[13,14] Podem também ser usados como membranas miméticas, para simular processos que ocorrem a nível biológico, com a vantagem, em relação aos sistemas biológicos reais, de terem uma estrutura muito mais simples e uma composição controlada pelo utilizador.

No âmbito deste trabalho utilizaram-se lipossomas nesta última perspetiva, ou seja, como membranas miméticas, para estudar a partição de um fármaco para membranas de diferentes composições. Os lípidos utilizados foram o 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) e o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS).

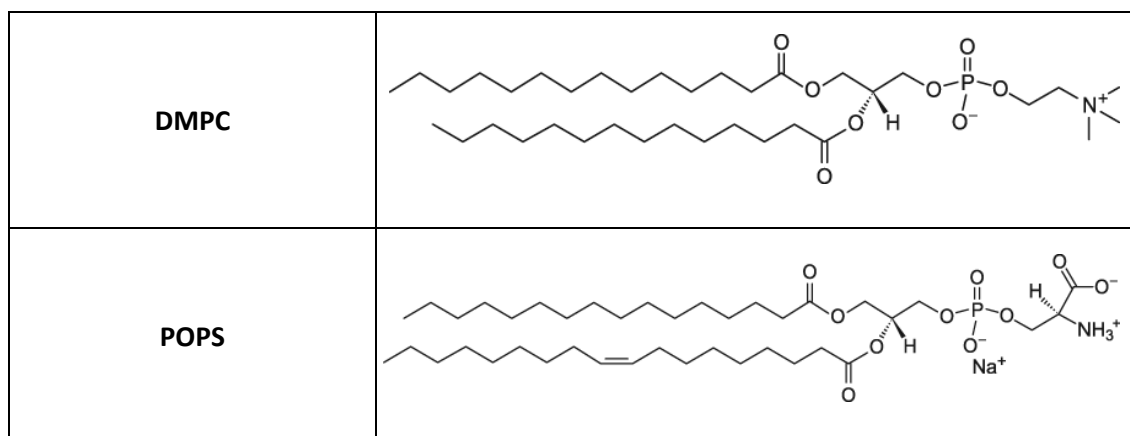


Figura 3. Estrutura química do 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) e o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS)

1.3.1. Tipos de lipossomas

É possível classificar os lipossomas tendo em conta o seu tamanho e o número de bicamadas fosfolipídicas.

Quando a classificação se baseia no número de bicamadas, os lipossomas podem ser considerados unilamelares quando possuem uma só bicamada ou multilamelares quando têm mais do que uma bicamada fosfolipídica. ^[1,11]

Os que possuem mais do que uma bicamada, são chamados de MLVs (multilamellar vesicles) e geralmente apresentam um tamanho compreendido entre 500 a 5000 nm. E os que possuem uma só bicamada são chamados de vesículas unilamelares, podendo ser unilamelares grandes LUVs (large unilamellar vesicles), com tamanhos entre 100 e 200 nm ou vesículas unilamelares pequenas, SUVs (small unilamellar vesicles) de tamanho entre aproximadamente 30-50 nm. Na Figura 10 estão representados diferentes lipossomas classificados quanto ao número de bicamadas que possuem e o seu tamanho.

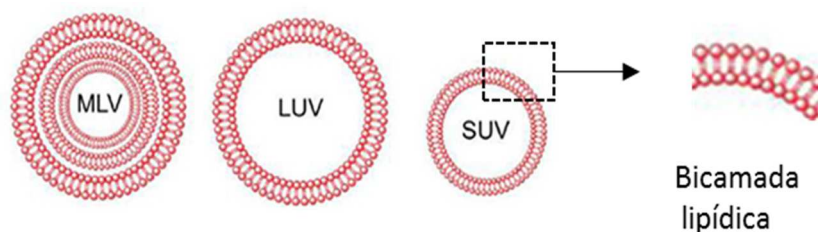


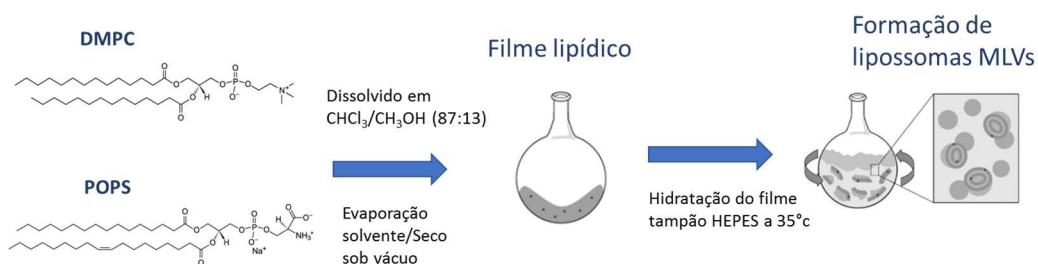
Figura 4. Classificação de lipossomas quanto ao tamanho e número de bicamadas

1.3.2. Métodos de preparação

Existem diferentes métodos de preparação de lipossomas, que resultam na formação de vesículas de diferentes tamanhos e características.^[1,11] Contudo, os mais utilizados são a hidratação do filme lipídico e a hidratação direta.

i. Hidratação do filme lipídico

A hidratação do filme lipídico é um processo clássico de preparação de lipossomas. É um método onde inicialmente se forma um filme lipídico, em camada fina e homogênea, através da dissolução do(s) lípido(s) num solvente orgânico e posterior evaporação do solvente sob uma corrente de azoto ou sob vácuo, com aquecimento. Após a formação do filme, a hidratação é feita utilizando uma solução aquosa de tampão a cerca de 10 °C acima da temperatura de transição principal do sistema lipídico, seguido de agitação em vortex. Esta sequência aquecimento/vortex é repetida várias vezes, para homogeneizar a suspensão, realizando-se cerca de 10 ciclos de vortex/aquecimento. Promove-se assim a formação da suspensão de vesículas multilamelares (MLVs).

Figura 5. Esquema da preparação da suspensão de vesículas multilamelares (MLVs)^[13]

ii. Hidratação direta

A hidratação direta é um método onde o lipossoma é preparado colocando o lípido sólido em contacto direto com a solução tampão aquecida como atrás descrito. Posteriormente é colocado num banho a cerca de 10 °C acima da sua temperatura de transição durante 30 min (hidratação) seguido de agitação no vortex para homogeneizar a suspensão, realizando 10 ciclos de vortex/aquecimento. A agitação no vortex é um passo importante pois permite que o sólido se desagregue e ao entrar em solução auto-agregue dando origem ao lipossoma.

iii. Extrusão

É um método que consiste na passagem forçada das suspensões lipídicas MLVs através de filtros de polycarbonato com um diâmetro de poro bem definido, sob pressão de uma corrente de azoto. O diâmetro dos filtros usados pode variar entre nanómetros e micrómetros. Com este processo é possível diminuir o número de bicamadas lipídicas, tornando assim os lipossomas em vesículas unilamelares mais homogêneas e mais pequenas, LUVs. O diâmetro final apresentado pelos lipossomas resultantes deste método depende diretamente do tamanho do poro da membrana de polycarbonato usado. ^[11,12,15] Um dos extrusores usado (macro) possui dois tambores, um grande com capacidade para 10mL e outro mais pequeno com capacidade para 5mL. Neste trabalho foram usados os dois tambores pois foram preparados diferentes volumes de sistemas lipídicos. Foi ainda usado um outro extrusor (micro), composto por duas seringas com capacidade para 500µL e um pequeno tambor, com duas peças no seu interior e o filtro é depois colocado no meio dessas mesmas peças como mostra a figura 6.

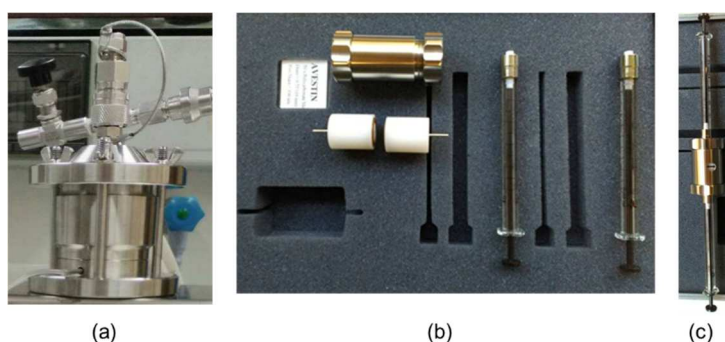


Figura 6. Extrusor macro (a), componentes do extrusor micro de “seringas” (b) e extrusor montado (c)

1.4. Transições de fase

As membranas compostas por lípidos podem apresentar-se em diferentes fases. Neste trabalho apenas se irá abordar em mais detalhe a fase lamelar, uma vez que os sistemas lipídicos utilizados se apresentavam nessa fase. A fase lamelar pode ser do tipo gel, mais rígida e ordenada ou do tipo cristal líquido, que é mais fluida e desordenada. As transições estudadas no âmbito deste trabalho estão representadas na Figura 7 - a pré-transição entre a fase $L_{\beta'}$ para $P_{\beta'}$ (ocorre nas PC de cadeia ≥ 14) e a transição principal entre as fases $P_{\beta'}$ e L_{α} .

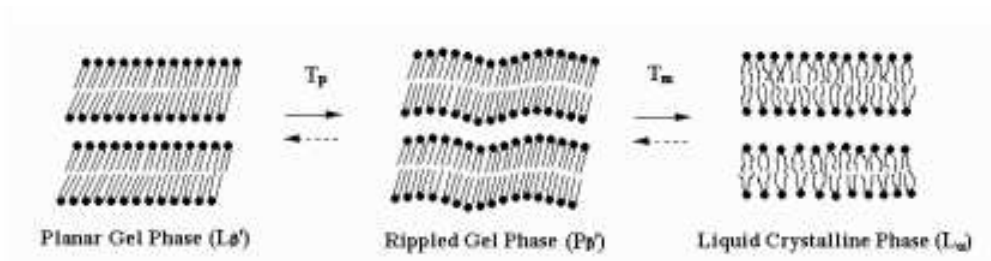


Figura 7. Transições na fase lamelar^[16]

Na fase gel, a cadeia hidrocarbonada do lípido está num estado mais organizado do que na fase cristal líquido onde as cadeias carbonadas têm movimentos mais livres e as cabeças hidrofílicas ficam completamente hidratadas. A saturação bem como o comprimento da cadeia lipídica, têm influência no valor da temperatura de transição de fase. Diferentes membranas compostas por diferentes lípidos apresentam níveis de fluidez distintos à mesma temperatura.

2. Interação com as membranas

Muitos fármacos não são reconhecidos por transportadores ativos, por isso a permeação passiva através da membrana é um caminho importante, ou mesmo fundamental,^[17] para a passagem de fármacos pela membrana.^[18] As membranas modelo com uma composição apropriada fornecem o modelo ideal para avaliar a permeação passiva. Em estudos de permeação passiva através das membranas sabe-se que o processo implica uma partição entre o meio aquoso e a superfície da membrana, ou inserção na mesma, a nível do folheto externo. Os modelos mais comuns indicam que o passo limitante pode ser a difusão através da membrana, ou seja, a translocação entre os dois folhetos da bicamada. A permeação através da membrana é um pré-requisito para um soluto chegar ao alvo intracelular e além disso determina a farmacocinética e toxicocinética desse mesmo soluto.

2.1. Clorpromazina- CPZ

Neste trabalho, pretendeu-se caracterizar este processo de partição/permeação de fármacos, e caracterizar a interação de uma molécula anfifílica com as membranas. Para tal estudou-se um fármaco estabelecido, usado no tratamento de doenças neurológicas, e droga modelo comum em estudos de permeação, a Clorpromazina (CPZ).

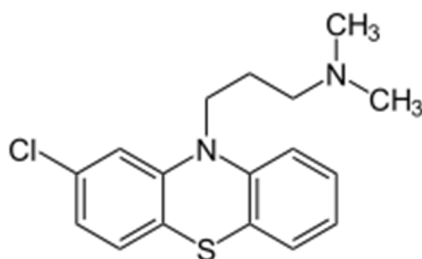


Figura 8. Estrutura química da Clorpromazina (CPZ)

A Clorpromazina é um fármaco muito utilizado no tratamento de doenças como a esquizofrenia. É uma molécula pequena, anfifílica e auto agrega a uma concentração crítica, formando estruturas tipo micelas que sofrem transições de fase dependentes da temperatura e da concentração.^[18] Possui uma amina terciária ($pK_a=9,35$), portanto as interações moleculares são fortemente dependentes do pH e da força iónica.

2.2. Partição simples

A composição lipídica das membranas tem influência nas propriedades superficiais das bicamadas lipídicas, como a carga e a geometria. A interação de um fármaco com a bicamada não é um equilíbrio químico convencional, no qual há uma estequiometria bem definida, sendo mais adequado tratar este fenómeno como um equilíbrio de partição água/bicamada lipídica. ^[19-21]

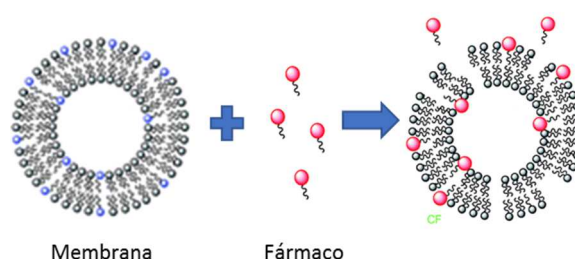


Figura 9. Exemplo esquemático de partição de um soluto para membrana

Uma forma de avaliar a ação de uma droga no organismo é através da sua repartição entre o meio aquoso e a membrana. Essa repartição pode ser caracterizada pelo coeficiente (ou constante) de partição K_p que é dado pela razão entre as concentrações da espécie na fase aquosa (C_1) e a sua concentração na membrana (C_2) como mostra a equação 1.

Um processo de partição simples pode-se definir como aquele que segue a lei de partição de Nernst, em que a razão entre as concentrações nas duas fases, C_1 e C_2 , é constante para uma dada temperatura. ^[22]

$$K_p = \frac{C_1}{C_2} \quad (1)$$

2.3. Outros modelos de partição

As membranas possuem um potencial electrostático na sua superfície, dependente da composição da cabeça dos lípidos que as compõem (zwiteriónicos ou carregados negativamente PS e PG), das proteínas membranares e iões dos sais adsorvidos na sua superfície. ^[23,24]

Neste trabalho, foi estudada a interação entre um fármaco catiónico e modelos de membranas: uma membrana zwitteriônica (DMPC) e duas misturas de lípido zwitteriônico e lípido carregado negativamente (DMPC E POPS) com o intuito de determinar o efeito do fármaco na membrana e caracterizar o equilíbrio de partição fármaco/membrana.

O modelo de partição simples acima mencionado é por vezes insuficiente para explicar a partição do fármaco para a membrana, particularmente no caso do fármaco, a membrana ou ambos terem carga, dado que nestes casos há efeitos de carga, que afetam o potencial da superfície da membrana. Uma análise adequada requer neste caso o recurso a um modelo para o equilíbrio de partição que tenha em conta a contribuição dos efeitos eletrostáticos, como se descreverá a seguir.

2.3.1. Efeitos de carga na superfície das membranas

Um parâmetro importante no comportamento dos sistemas biológicos é a carga existente, quer nas membranas, proteínas, péptidos, etc. Adicionalmente, quando consideramos fármacos, a sua carga é um fator fundamental na sua interação com a membrana. O equilíbrio eletroquímico na superfície da membrana resulta num potencial de superfície. Em estudos de interação de fármacos para as membranas, o uso de um modelo de partição simples, por vezes não é suficiente para a explicação do fenómeno de partição uma vez que há efeitos de carga, dada a existência de cargas na membrana e/ou na espécie que particiona, e assim o potencial de superfície da membrana é alterado com a partição. Um modelo teórico considerado adequado para descrever a parte electroestática das interações fármaco/membrana, é o modelo de Gouy-Chapman, também designado como modelo da dupla camada elétrica. Este modelo faz uma descrição matemática das propriedades de uma interface plana carregada e da dependência entre a densidade superficial de carga (σ), o potencial na superfície da membrana Ψ_0 na concentração do eletrólito (c) na solução.

2.3.2. Teoria de Gouy-Chapman-Stern

Sistemas de partículas coloidais, como os lipossomas, podem ter intrinsecamente uma superfície carregada, dependendo dos lípidos que os compõem, ou adquirir uma superfície carregada quando dispersos numa solução de eletrólito, devido à adsorção de iões da solução.

O modelo habitualmente usado para caraterizar estas superfícies carregadas é o modelo de Gouy-Chapman. Neste considera-se a existência de uma dupla camada difusa adjacente a uma interface plana, em que há um decaimento exponencial do potencial com o aumento da distância entre a superfície e a solução, e pode ser visto em representação esquemática na figura 10. [25] A superfície tem um potencial Ψ_0 , e a zona que faz a separação dos iões adsorvidos na superfície dos iões da camada difusa, é designada camada de Stern e tem um potencial Ψ_δ .

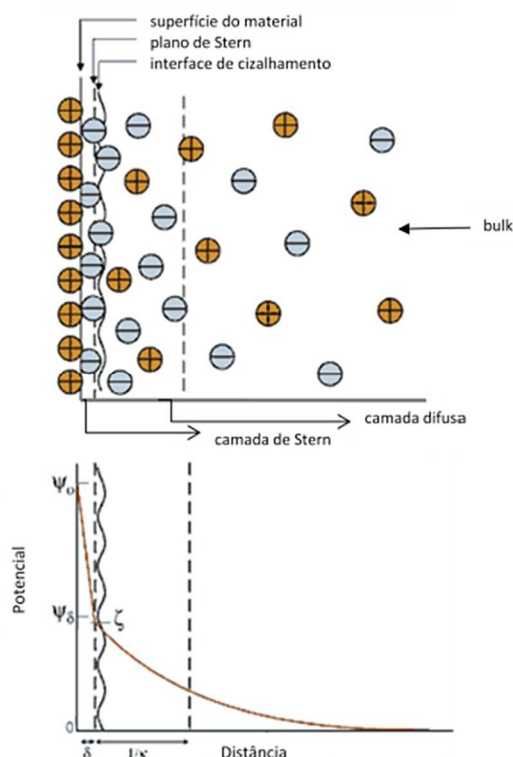


Figura 10. Representação esquemática das cargas e dos potenciais numa interface carregada positivamente Ψ_0 , - potencial na superfície; Ψ_δ - potencial de Stern; δ - espessura da camada de Stern; $1/\kappa$ - comprimento de Debye (distância onde ocorre a separação de cargas) [26]

Uma extensão deste modelo foi proposta por Stern, que considerou que a curtas distâncias da superfície, pode existir uma interação química específica entre os iões e a superfície. A teoria passou assim a ser conhecida como teoria de Gouy-Chapman-Stern e considera que na adsorção dos contra-íons só há interações de natureza coulombiana e o processo é considerado semelhante ao de adsorção de Langmuir em que: i) todos os locais de adsorção na superfície são equivalentes; ii) as partículas adsorvidas não interagem entre si; iii) todo o processo de adsorção ocorre pelo mesmo mecanismo e iv) as moléculas não adsorvidas permanecem livres na solução. [26,23]

A interação entre as cargas fixas na superfície da membrana e as que estão livres em solução é caracterizada por uma densidade de carga na superfície σ e por um potencial de superfície Ψ . A solução adjacente à membrana possui eletrólitos com valência z_i numa concentração c_i dispersos num solvente com constante dielétrica ϵ_r e numa interface com constante dielétrica ϵ_0 .

A distribuição das espécies carregadas, de concentração total c_i , na solução aquosa $c_{i,aq}$ e na interface $c_{i,sup}$, está relacionada exponencialmente com o potencial de superfície (Ψ), e segue uma distribuição de Boltzmann:

$$c_{i,sup} = c_{i,aq} \exp\left(\frac{-z_i F \Psi}{RT}\right) \quad (2)$$

em que $c_{i,sup}$ é a concentração da espécie carregada na superfície da membrana; $c_{i,aq}$ é a concentração da espécie carregada na solução aquosa; z_i a valência das espécies carregadas; Ψ o potencial de superfície; T a temperatura absoluta; F a constante de Faraday; R a constante dos gases ideais.

O potencial de superfície Ψ_o pode ser calculado a partir do potencial medido a uma distância x da membrana, Ψ_x . O potencial medido no ponto entre o limite da camada de Stern e o início da camada difusa é chamado potencial zeta (ζ) (Figura 10). Para superfícies macias como os lipossomas, o potencial zeta é definido como o potencial electrostático medido a 0.2 nm (2Å) da superfície e pode considerar-se que a esta distância $\Psi_x = \zeta$ ^[27,28]

A dependência entre o potencial de superfície, Ψ_o , e a densidade de carga na superfície, σ , é descrita através da equação:

$$\sigma = \sqrt{2000 \epsilon_r \epsilon_0 RT \sum c_i \left\{ \exp\left(\frac{-z_i F \Psi_o}{RT}\right) - 1 \right\}} \quad (3)$$

em que c_i é a concentração dos iões na solução de eletrólito.

A teoria de Gouy-Chapman descreve bem o potencial em superfícies planas e na presença de soluções diluídas de eletrólitos simétricos como NaCl. No caso presente dos lipossomas, estes não são obviamente uma superfície plana, mas dado terem uma dimensão muito superior à espécie que particiona, o modelo funciona muito bem na avaliação dos efeitos eletrostáticos na partição.

No entanto tem algumas limitações.^[29] Nesta teoria, os iões são tratados como cargas pontuais e considera-se o solvente como um meio contínuo com constante dielétrica uniforme e viscosidade constante, desprezando-se as interações ião-ião. As

únicas interações significativas são coulombianas, e não se considera a repulsão entre os iões com a mesma carga ou interações de outra natureza (van der Waals, ião - dipolo e ligações de H). Na teoria de Gouy-Chapman, a adsorção é não específica e à priori todos os iões com a mesma carga produziram na superfície o mesmo potencial Ψ_0 e uma densidade de carga constante σ .

3. Calorimetria

A calorimetria abarca um conjunto de técnicas que medem as trocas de calor que têm lugar em qualquer processo físico ou químico. No século dezoito surgem as primeiras determinações calorimétricas, relacionadas com a determinação das entalpias de fusão e vaporização. Nas décadas seguintes, a macrocalorimetria teve um grande desenvolvimento, em aplicações a reações químicas e determinação de propriedades físicas. Em 1923 Tian construiu o primeiro calorímetro de condução de calor, e Calvet e Tian introduziram o princípio das células gêmeas (“twin cells”) para determinações de pequenas quantidades de calor com elevada sensibilidade. Esta descoberta é considerada o início da microcalorimetria.

A calorimetria além de ser usada como técnica analítica permite também a caracterização de fenómenos biológicos ou de relevância biológica e a determinação dos parâmetros termodinâmicos associados. A p e T constante (as condições mais comuns nesta área), as propriedades que habitualmente se medem são a variação da entalpia, da função de Gibbs, da capacidade calorífica.^[30]

Os calorímetros podem ser divididos em dois grupos tendo em conta os princípios de medição de calor, podendo ser de condução de calor ou de compensação de energia.

No caso dos calorímetros de condução de calor, há a transferência de calor entre o vaso calorimétrico e um reservatório de calor, normalmente um bloco de alumínio, mantido a temperatura contante por inserção num banho termostático de alta precisão. As trocas de calor entre o vaso calorimétrico e o reservatório de calor permitem manter a temperatura do vaso calorimétrico constante. Neste tipo de instrumentos, é medido o fluxo de calor entre o calorímetro e o reservatório de calor, havendo uma termopilha entre o vaso calorimétrico e o reservatório de calor. A passagem de calor pela termopilha gera uma diferença de potencial.

Nos calorímetros de compensação de energia, a compensação ocorre através da variação da energia fornecida a duas resistências, uma de cada lado do canal gêmeo. Uma dada corrente, muito baixa, é fornecida constantemente a duas resistências colocadas uma junto da célula da amostra e outra da referência. Quando ocorre uma reação, a energia fornecida do lado da amostra é aumentada ou diminuída dependendo se é uma reação endo- ou exotérmica, de modo a manter os dois lados sempre à mesma temperatura. Medições com este tipo de instrumento são então feitas em condições praticamente isotérmicas, isto é a temperatura constante uma vez que a potência fornecida é muito baixa.^[30] No âmbito deste trabalho foram utilizados calorímetros de compensação de energia, nomeadamente dois calorímetros diferenciais de varrimento

(DSC) e um calorímetro de titulação isotérmica (ITC), que vão ser abordados mais detalhadamente.

3.1. DSC- Calorimetria diferencial de varrimento

A (micro)calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica muito utilizada no estudo de transições de fase e alterações conformacionais em sistemas biológicos, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e agregados de lípidos.^[31] A calorimetria diferencial de varrimento é também usada para monitorizar e caracterizar as alterações do estado físico das membranas lipídicas e também para caracterizar as perturbações de lípidos puros pelas interações com outros materiais, tais como outros lípidos, proteínas, iões ou moléculas hidrofóbicas pequenas. Numa experiência de calorimetria diferencial de varrimento é possível determinar vários parâmetros termodinâmicos, tais como a temperatura de transição de fase (T_m), a entalpia de transição (ΔH), a cooperatividade da transição e em casos especiais e calorímetros de alta sensibilidade também a variação da capacidade calorífica entre o estado inicial e final.

Em calorímetros diferenciais de varrimento é medida a diferença de potência aplicada às resistências do lado da amostra e do da referência, mantendo assim a amostra e a referência à mesma temperatura, à medida que é variada a temperatura dos dois lados de uma forma controlada. Os varrimentos são efetuados com aumento ou diminuição da temperatura a velocidade constante, escolhida pelo utilizador.^[32] A diferença de potência medida relaciona-se com a diferença de capacidade calorífica entre a amostra e a referência.

Através de um ensaio de DSC, obtém-se uma curva típica em que se verifica uma linha de base inicial que indica o equilíbrio entre as células, seguida de uma deflexão no sinal durante a transição de fase e um retorno à linha de base quando essa transição termina. O ponto máximo dessa curva indica a temperatura de transição T_m da amostra. A curva que é obtida corresponde à potência, ou fluxo de calor φ em função do tempo.

Através da razão entre o fluxo e a velocidade de aquecimento β é possível obter-se o valor da capacidade calorífica correspondente C_p de acordo com as seguintes equações:

$$\varphi = \frac{dQ}{dt} \quad (4)$$

$$\beta = \frac{dT}{dt} \quad (5)$$

$$C_p = \frac{\frac{dQ}{dt}}{\frac{dT}{dt}} \quad (=) \quad C_p = \frac{dQ}{dT} \quad (6)$$

em que Q corresponde ao calor envolvido na transição, t ao tempo e T à temperatura.

Numa experiência de DSC, obtém-se uma curva da capacidade calorífica C_p em função da temperatura T .^[32] O valor da entalpia da transição, ΔH , é obtido através da integração da área da curva de C_p em função da temperatura T no intervalo de transição de fase:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad (7)$$

O DSC usado está ligado a um computador onde é possível fazer a programação e aquisição dos dados. Foi ainda usado um Thermovac, que permite evacuar as amostras líquidas a temperatura controlada, antes de serem inseridas no calorímetro. Este tipo de calorímetro consiste em duas células, uma para a amostra e outra de referência, sem fase gasosa.

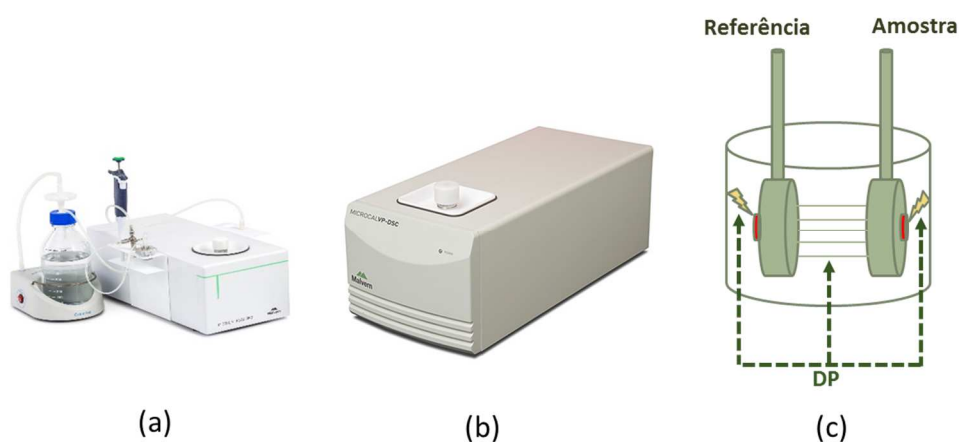


Figura 11. Os instrumentos de DSC usados, da Microcal/Malvern: (a) PEAQDSC; (b) VP-DSC e (c) Representação esquemática do interior do calorímetro, com células de amostra e referência

3.2. ITC- Calorimetria isotérmica de titulação

A calorimetria isotérmica de titulação, ITC, é uma técnica analítica que se tornou uma das mais importantes técnicas na caracterização de interações moleculares, em particular na área biológica desde o advento dos microcalorímetros de elevada sensibilidade, na década de sessenta. ^[33] Numa experiência de ITC pode medir-se o calor resultante da interação de duas biomoléculas, titulante e titulado a uma dada temperatura, permitindo a determinação de parâmetros termodinâmicos que caracterizam a interação. ^[34]

Dependendo das condições e do tipo de experiências, os parâmetros termodinâmicos, constantes de equilíbrio K , e a variação de entalpia da reação (ΔH) podem ser obtidos, e também ainda a estequiometria da interação N . A partir desses, outros parâmetros termodinâmicos como a energia de Gibbs (ΔG) e a entropia (ΔS) podem ser facilmente calculados, fornecendo assim uma caracterização termodinâmica completa da interação, a uma dada temperatura. ^[34] Alternativamente, em estudos envolvendo membranas, como no presente caso, este calorímetro permite vir a obter, por tratamento de dados apropriado, o valor da constante de partição, K , e da entalpia de partição, ΔH , associadas ao processo de partição.

O aparelho usado, o VP-ITC, da Microcal/Malvern, tem como princípio de funcionamento a compensação de energia. É constituído por um par de células idênticas em forma de moeda, que estão fixas no interior de um cilindro adiabático, estando ligadas ao exterior do calorímetro através de dois tubos cilíndricos. Possui dois circuitos de compensação independentes, um que mede a diferença de temperatura entre as células da amostra e referência e outro que controla a diferença de temperatura entre as células e o cilindro onde estão fixas. O ITC utiliza um sistema de feedback para compensar o calor que é libertado ou absorvido durante a reação química, que aumenta ou diminui a quantidade de calor fornecida à célula da amostra. Assim a diferença de temperatura entre as células é mantida constante e muito próxima de zero. ^[35,36]

Nas experiências de titulação, a seringa contém uma das espécies a reagir e a célula da amostra contém a outra. A seringa roda sobre si própria ao mesmo tempo que faz as injeções, funcionando a agulha, com a ponta modificada, como agitador, garantindo assim a homogeneização constante da mistura dentro da célula. A sequência de injeções é programada sendo possível definir o volume de solução a ser injetado para a célula e o intervalo entre cada injeção. A interação entre as espécies envolvidas na reação vai provocar um efeito térmico, exo ou endotérmico, que resulta numa deflexão. Essa deflexão é proporcional à potência calorífica que é necessário fornecer

ou retirar a célula da amostra mantendo assim a diferença de temperatura entre as células próxima de zero. O calor associado a cada injeção é calculado integrando a área de cada pico.

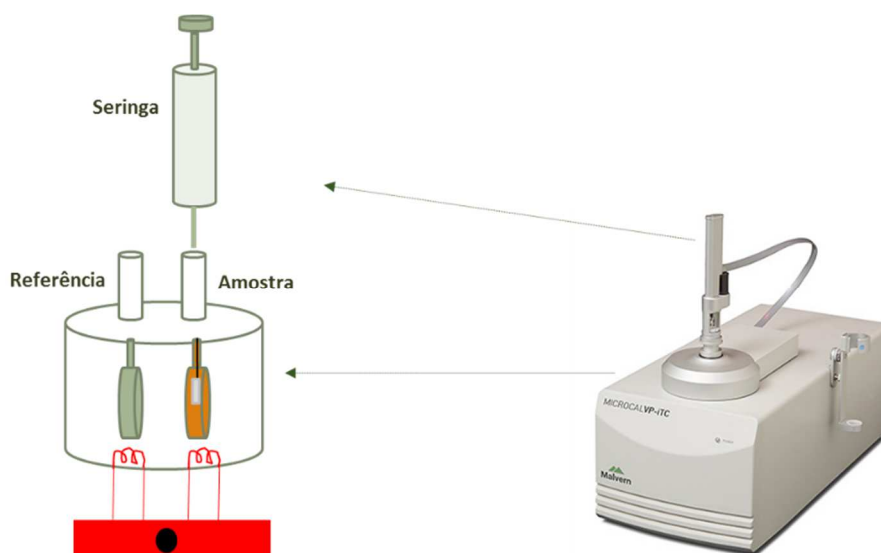


Figura 12. Representação esquemática do interior do VP-ITC (Microcal/Malvern)

No final de cada experiência de titulação obtém-se um termograma, ou seja, uma curva com um conjunto de picos, cada um correspondente a uma injeção. O programa associado permite também tratamento dos dados, podendo obter-se os valores numéricos correspondentes à quantidade de calor envolvida em cada injeção, a concentração da espécie que estava na célula após cada injeção, a concentração na célula da espécie que estava na seringa após cada injeção, a razão molar após cada injeção entre a espécie injetada e a espécie contida na célula e ainda a variação de entalpia por mole de reagente para cada, ΔH . No presente trabalho, no entanto, foi usado um programa externo para avaliação destes resultados, como será referido na parte experimental.

No âmbito deste trabalho o DSC foi usado para caracterizar o perfil térmico, em diferentes condições (meio, pH, tampão, adição de sal, composição lipídica das membranas), de diferentes membranas modelo na ausência e presença de diferentes quantidades de CPZ, e o ITC para estudar a partição da CPZ para essas mesmas membranas.

4. Espectroscopia Ultravioleta-visível UV-Vis

A radiação ultravioleta UV e radiação visível compreendem uma pequena parte do espectro eletromagnético, que inclui outras formas de radiação, como o infravermelho (IV), raios X, raios cósmicos entre outras. Quando a radiação interage com a matéria, há inúmeros processos que podem ocorrer, incluindo a reflexão, espalhamento, absorvância, fluorescência/fosforescência e reações fotoquímicas.

A espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis) envolve transições eletrônicas numa espécie química, através da absorção de luz. É usado um espectrofotómetro que mede a intensidade da luz absorvida pela amostra num intervalo de comprimentos de onda escolhido. A luz passa através de um monocromador para selecionar o comprimento de onda e após essa passagem, a luz monocromática com radiação P_0 é irradiada sobre a célula de comprimento l . A luz irradiada, surge do outro lado da célula como P , sendo que parte dessa luz pode ser absorvida pela amostra, daí $P \leq P_0$.

Tendo em conta esse valor P a intensidade de radiação transmitida e P_0 é possível determinar a transmitância (T), ou seja, a fração de luz que passa através da amostra. [37]

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (8)$$

A partir da transmitância é possível determinar a absorvância, através da seguinte equação:

$$A = \text{Log} \left(\frac{P_0}{P} \right) = -\text{Log} T \quad (9)$$

Para determinar a concentração da amostra, tendo em conta a absorvância, é necessário recorrer à lei de Lambert Beer. A lei de Lambert Beer correlaciona o comprimento de célula, l , por onde passou a feixe irradiado, a concentração, c , e a absortividade molar ou coeficiente de extinção molar, ε que indica a capacidade de absorção de luz de uma molécula.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (10)$$

No âmbito deste trabalho esta técnica também foi utilizada com o objetivo de estabelecer um protocolo que permita determinar a temperatura de transição dos lipossomas, tomando partido da diferença de dispersão ótica que se observa quando estes estão na fase gel ou na fase cristal líquido.

PARTE EXPERIMENTAL

-
1. Materiais e métodos
 2. Técnicas experimentais

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiais e métodos

1.1. Reagentes

Os lípidos usados, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS) foram da Avanti Polar Lipids, Inc e a clorpromazina foi da Sigma-Aldrich Química (> 98% (TLC)).

Na preparação do tampão usou-se HEPES - Ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico] (Sigma, 99,5%), NaCl - Cloreto de sódio (Merck, 99,5%), EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético (Merck, 99,0%), e NaN_3 - Azida de sódio (Merck, 99,0%). Todos os reagentes foram usados como recebidos, sem purificações adicionais.

Para a determinação rigorosa da concentração lipídica foram também usados o Molibdato de Amónio (Merck, 83%), clorofórmio (Prolabo), metanol (Prolabo 100%), H_2O_2 (Prolabo, 30%), ácido sulfúrico (Pronalab, 96%) e ácido aminonaftilsulfónico (Fiske & Subbarrow, Sigma). A água usada foi ultra-pura, sistema MilliQ, e para limpeza das células calorimétricas usou-se álcool etílico (Aga 99,55% vol), solução comercial de tensoativos Decon (fornecido pela Malvern/Microcal), usando-se uma solução a 5% (vol/vol).

1.2. Preparação dos lipossomas e quantificação lipídica

1.2.1. Preparação tampão HEPES

Foram pesadas para um funil de pesagem as quantidades de HEPES, NaCl, EDTA e NaN_3 necessárias para a preparação de uma solução 10mM HEPES, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,02%(m/v) NaN_3 . Após pesagem foram transferidos para um balão volumétrico e foi adicionada água Millipore até perfazer o volume pretendido. Seguidamente foi medido o pH da solução resultante e ajustado a pH=7,46. Na medição do pH foi utilizado o medidor de marca Meterlab.

1.2.2. Preparação dos lipossomas

Dependendo da concentração desejada, a quantidade de lípido pretendida foi pesada para um funil de pesagem, e depois transferida para um balão de fundo redondo. De seguida foi adicionada uma mistura azeotrópica de clorofórmio/metanol (87:13) para dissolver o(s) lípido(s). Para garantir que todo o lípido contido no funil de pesagem é transferido para o balão fez-se passar pelo funil essa mistura azeotrópica. No caso das misturas de lípidos, esperou-se uma hora antes de proceder à evaporação do solvente, para garantir uma boa homogeneização da solução e mistura dos lípidos no solvente.

Noutros casos foram preparadas soluções stock de cada lípido na mistura azeotrópica de clorofórmio/metanol (87:13) pesando a quantidade pretendida de lípido e dissolvendo na mistura. As soluções stock foram guardadas a -20°C . As misturas de lípidos eram depois preparadas no momento de preparação dos lipossomas, aguardando-se o tempo de mistura acima descrito.

Após a dissolução do lípido evaporou-se o solvente num evaporador rotativo (figura 13), sendo depois o balão mantido sob pressão reduzida durante pelo menos 10 h para garantir a secagem total do filme lipídico.

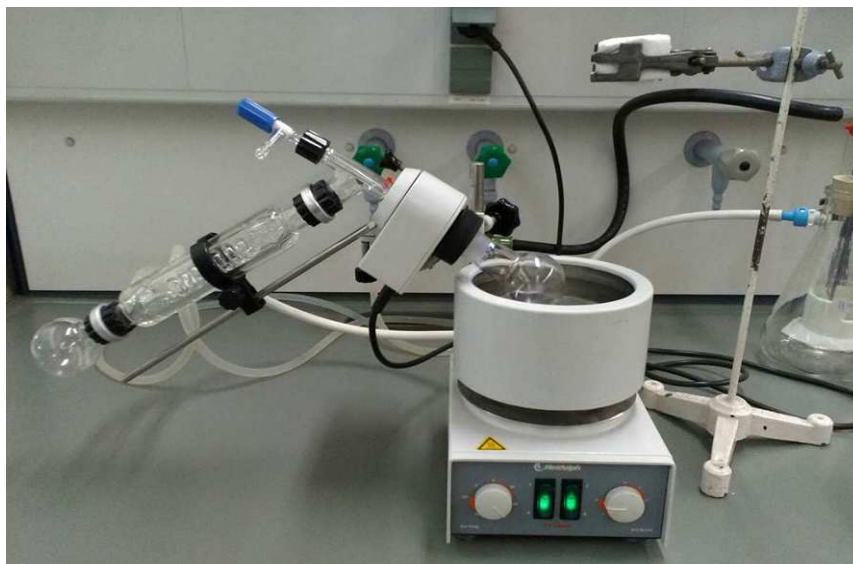


Figura 13. Montagem do evaporador rotativo utilizado

Seguidamente foi feita a hidratação do filme adicionando tampão HEPES previamente aquecido a uma temperatura de cerca de 10°C acima da sua temperatura de transição, mantendo depois num banho termostático durante 30 minutos. De seguida foram feitos ciclos de vortex/aquecimento para obter a suspensão em tampão, com a

formação de uma suspensão de vesículas multilamelares (MLV). Foram ainda feitos 5 ciclos de congelação/ descongelação em azoto líquido.

Finalmente procedeu-se à extrusão, usando um extrusor (figura 14) com tambores de 5 e 10 mL (LipexBiomembranes) ou um extrusor portátil com 2 seringas Hamilton de 500 μ L (Liposofast, Avestin). No caso do extrusor da Lipex foram usadas membranas de polycarbonato (Nucleopore) com poros de diâmetros decrescentes, 600, 200 e 100 nm. Colocou-se o filtro de tamanho pretendido e foi montada a parte superior do aparelho. De seguida encheu-se o tambor com a suspensão de MLVs usando uma pipeta de Pasteur e fechou-se o aparelho. Foi aberta a corrente de azoto e a suspensão foi recolhida num frasco de vidro castanho para evitar assim a oxidação dos lípidos com o tempo. Foram feitas 5 passagens pelo filtro de 600 nm, 10 passagens pelo filtro de 200 nm e 50 passagens pelo filtro de 100nm. Terminada a extrusão, o aparelho é desmontado e é feita uma lavagem extensiva com álcool, e as peças são secas e guardadas. Com o extrusor de seringas foram usados apenas os filtros de 100 nm, sendo feitas 30 passagens. No final de cada extrusão o tamanho dos lipossomas foi sempre confirmado por dispersão dinâmica de luz (DLS).

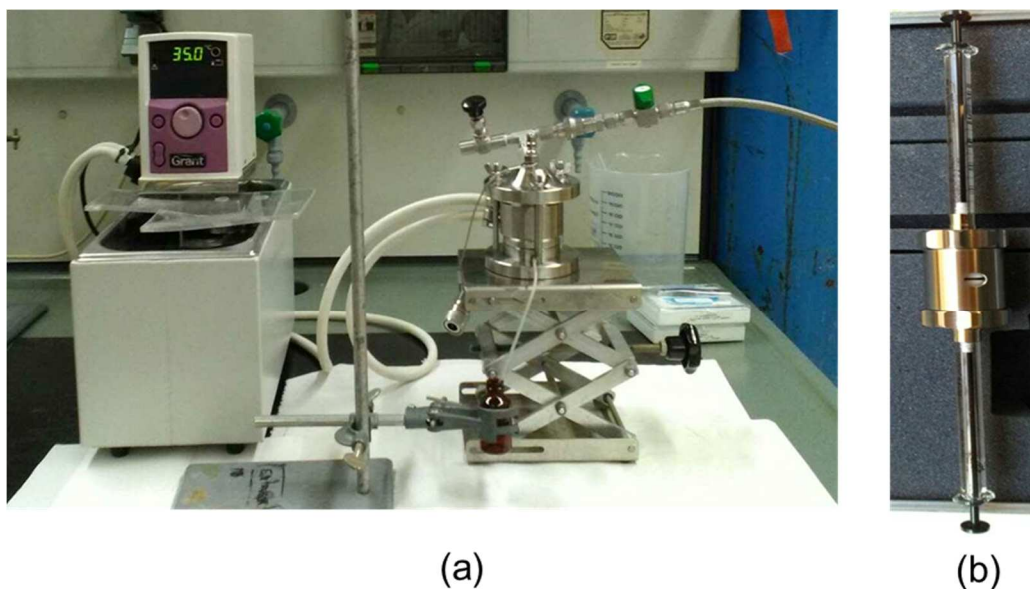


Figura 14. Esquema de montagem para a extrusão (a), extrusor portátil (b)

1.2.3. Determinação do tamanho dos Lipossomas por DLS

Para a medição dos tamanhos dos lipossomas foi usado o Nano ZS da Malvern. A velocidade das partículas e a taxa de variação da luz dispersa é expressa pelo coeficiente de difusão translacional (D) no meio dispersante. Este coeficiente pode ser obtido através de uma função de auto-correlação, gerada através da comparação de intensidades do sinal da luz dispersa no tempo t .

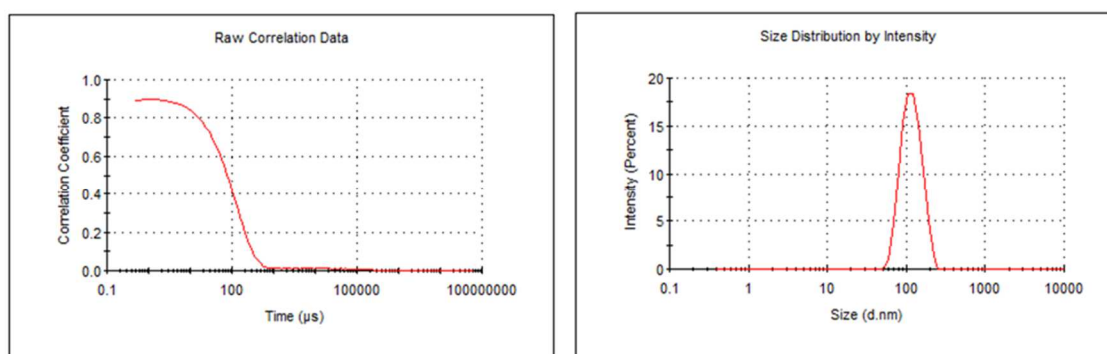


Figura 15. Curva de correlação em função do tempo e distribuição de tamanhos das vesículas

O coeficiente de difusão translacional D , permite calcular o raio hidrodinâmico (equação 11) das partículas a partir da equação de Stokes-Einstein. [38]

$$r(H) = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (11)$$

onde $r(H)$ o raio hidrodinâmico, D coeficiente de difusão translacional (nm^2/s), k constante de Boltzman (J/K), T temperatura absoluta (K) e η a viscosidade.

1.2.4. Quantificação dos fosfolípidos

Um método muito utilizado na medição da concentração de fosfolípidos, é o método Bartlett, também conhecido como o método do fosfomolibdato. [39]

Os ensaios foram realizados com triplicados das amostras. As amostras originais foram diluídas para a concentração de 0,15mM, pipetadas para tubos de borossilicato e mineralizadas em solução de H_2SO_4 e H_2O_2 , à temperatura de 189 °C. Seguidamente adiciona-se uma solução de molibdato de amónio e um reagente redutor, ácido

aminonaftilsulfónico (Fiske & Subbarrow), formando-se um complexo de cor azul (azul de molibdénio). [40]

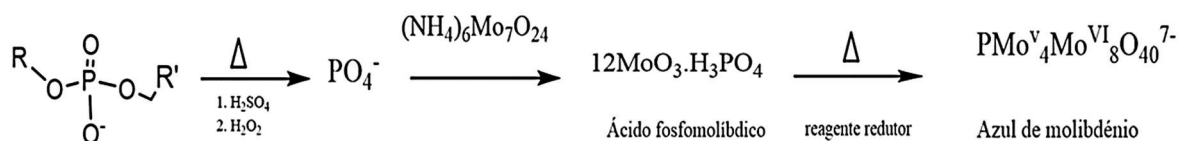


Figura 16. Reações envolvidas no método de quantificação

A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de fósforo na amostra e é determinada através de uma curva de calibração previamente estabelecida com soluções padrão. Para tal foram preparadas soluções padrão com dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) numa gama de concentração de fósforo de 0.064 a 0.256 μM . As leituras foram feitas num espectrofotómetro (*AGILENT 8453 UV-Visible Spectroscopy System*, Waldbronn, BW-GERMANY)) de ultravioleta-visível UV-VIS a 825 nm e percurso ótico de 1 cm.

1.3. Preparação da solução de CPZ

Foram preparadas soluções de CPZ de concentração 600 μM . A quantidade de CPZ pretendida foi pesada para um eppendorf previamente tarado e de seguida foi dissolvida em tampão HEPES. A solução de CPZ foi guardada no frigorífico ao abrigo da luz.

2. Técnicas experimentais

2.1. Calorimetria diferencial de varrimento, DSC

As experiências de DSC foram realizadas em dois calorímetros, PEAQ-DSC e VP-DSC. No caso do VP-DSC as amostras foram desarejadas no Thermovac antes de cada experiência. No caso do PEAQ-DSC esse procedimento não é considerado necessário.

2.1.1. Procedimento

Procedimento usado no caso do VP-DSC

Colocou-se cerca de 1 mL de amostra a desarejar, num tubo de vidro, sob agitação com um agitador magnético no Thermovac. Terminado o desarejamento, carregou-se a amostra com uma seringa de vidro Hamilton “*gas -tight*” no lado reacional, e foi usada uma seringa de nível para retirar o excesso de amostra da célula calorimétrica. Na célula de referência colocou-se tampão, também desarejado. Depois do carregamento das células, fechou-se o aparelho e fez-se a programação, estabelecendo o intervalo de temperatura da medição apropriado, usando uma velocidade de varrimento 60°C/h.

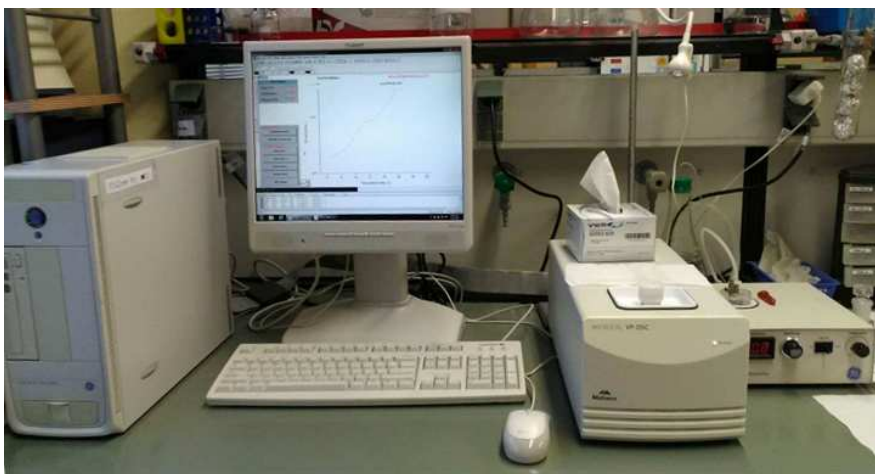


Figura 17. Setup VP-DSC

Após cada ensaio, a célula foi lavada cerca de 30 vezes com água Millipore. Ao fim do dia era feita lavagem com álcool, seguida de extensa lavagem automática com água em fluxo (cerca de 250 mL).

As seringas foram lavadas também com álcool e secas em fluxo de N₂. No fim dos ensaios com cada sistema lipídico lavaram-se ambas as células com uma solução de detergente Decon a 10%, seguida de 30 lavagens em cada célula com água millipore e por fim fez-se uma lavagem automática (300 mL de água).

Procedimento usado no caso do PEAQ-DSC

No caso do PEAQ-DSC, as soluções não são desarejadas, e o carregamento das células é feito com uma pipeta Gilson. O restante procedimento era igual ao descrito para o VP-DSC.

Em todas as experiências foram feitos vários varrimentos com tampão-tampão. Estas experiências com solução tampão nas células na referência e amostra (ensaio do branco) foram feitas nas mesmas condições de ensaio das amostras

2.1.2. Tratamento de resultados

A programação, aquisição e tratamento dos dados das experiências de DSC foram efetuadas com o programa Origin.

Para o cálculo da variação de entalpia molar de transição (ΔH) usou-se o seguinte procedimento:

- a. A cada experiência foi subtraído o respetivo branco, feito nas mesmas condições;
- b. Foi utilizada uma linha de base linear para permitir o cálculo do integral da área da curva, sendo a linha de base subtraída;
- c. Para consistência e comparabilidade de todos os resultados, a integração foi sempre feita entre os pontos representando o início do desvio da curva e o seu retorno à linha de base;
- d. A temperatura de transição reportada é a fornecida pelo programa. Em transições simples, corresponde ao máximo de C_p . Quando há algum desdobramento dos picos (no caso das misturas de DMPC:POPS com CPZ), dado que o desdobramento não é muito pronunciado, a T_m apresentada

corresponde à calculada pelo programa, sensivelmente a meio das transições observadas. Na figura 18 está representada a curva típica obtida por DSC.

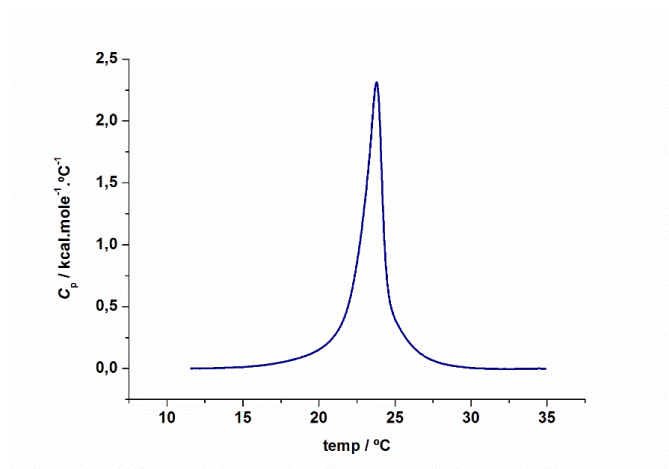


Figura 18. Curva típica obtida por DSC

Foram caracterizados por DSC os sistemas lipídicos, DMPC, DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1), usando uma concentração 3mM, assim como o efeito que a CPZ provoca nas membranas, fazendo ensaios de DSC de misturas lípido/CPZ de proporções variáveis - (L:P- 5:1;10:1;20:1;30:1).

2.2. Calorimetria de titulação isotérmica, ITC

As experiências de calorimetria de titulação isotérmica foram realizadas no VP-ITC da Microcal. Foi usado o protocolo '*uptake*', em que a suspensão de lipossomas é colocada na seringa e titulada na solução de CPZ que está na célula. Em todas as experiências foi seguido o procedimento descrito a seguir.

2.2.1. Procedimento

As amostras (solução de CPZ e suspensão de lipossomas) foram desarejadas antes de cada experiência. No calorímetro, na célula de referência é colocado tampão, e no lado da amostra é carregada a solução de CPZ no mesmo tampão.

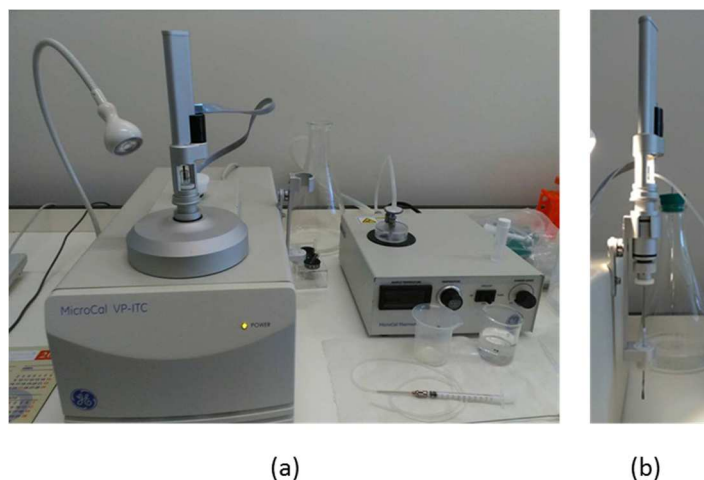


Figura 19. Setup VP- ITC (a) e detalhe da seringa de titulação (b)

A seringa de titulação é carregada através de outra seringa de plástico com um tubo de borracha e após o carregamento, é feito um “*purge/refill*”. De seguida a seringa de titulação é colocada na célula e faz-se a programação, estabelecendo o número de injeções, o volume de cada injeção (sendo a primeira injeção sempre menor do que as restantes pois o contacto entre a solução da seringa e o conteúdo da célula durante o tempo de estabilização antes do início da titulação leva a que o conteúdo da primeira injeção possa estar alterado porque há difusão de e para a seringa).

2.2.2. Tratamento de resultados

Através desta técnica obtêm-se termogramas como o apresentado na figura 20, em que cada pico corresponde a uma injeção. Os picos foram integrados num programa chamado NITPIC, desenvolvido na University of Texas Southwestern Medical Center, U.S.A., ^[41,42] obtendo-se o calor libertado ou absorvido em cada injeção.

A constante de partição é obtida a partir da experiência de titulação isotérmica, em que a CPZ é colocada na célula calorimétrica e é titulada com a suspensão de lipossomas. À medida que o número de injeções aumenta, a quantidade de CPZ livre em solução é cada vez menor. O calor envolvido em cada injeção também diminui, até haver um excesso de lípido na célula. Com o aproximar do fim da titulação, basicamente toda a CPZ particionou para a membrana e obtém-se um calor contante nas últimas injeções que diz respeito à diluição do lípido.

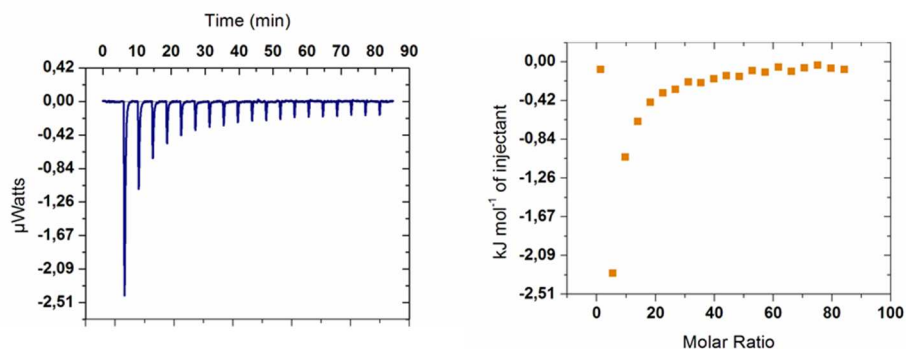


Figura 20. Termograma típico das experiências de titulação realizadas (esquerda) e representação gráfica do calor por injeção em função da razão molar $[\text{lip}]/[\text{CPZ}]$

Os valores obtidos foram introduzidos em duas folhas de cálculo:

1. Numa folha desenvolvida pela Prof. Maria João Moreno, Universidade de Coimbra, que permite calcular a constante de partição correspondente a um modelo de partição simples, habitualmente referida como constante de partição observada. Esta folha permite também obter a variação de entalpia da partição, (ΔH) , e a entalpia de diluição, usando um método de ajuste não linear;

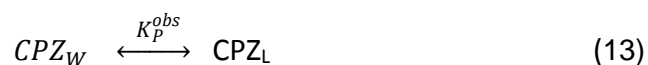
2. Uma folha Excel desenvolvida pelo Prof. Sandro Keller, Kaiserlautern, Alemanha, para obter os valores de constante de partição (K_p) corrigida quanto aos efeitos eletrostáticos. Neste caso também se obtém, como anteriormente, a variação de entalpia (ΔH) , e a entalpia de diluição, usando um método de ajuste não linear.

A seguir descrevem-se brevemente as expressões associadas aos cálculos realizados. O calor previsto envolvido $q(i)$ no passo i da titulação foi calculado segundo a equação 12

$$q(i) = \Delta H \left(n_{\text{CPZ}_L}(i) - n_{\text{CPZ}_L}(i-1) \left(1 - \frac{V(i)}{V_{\text{cell}}} \right) \right) + q_{\text{dil}} \quad (12)$$

em que $V(i)$ representa o volume de injeção, V_{cell} o volume da célula, q_{dil} o calor de diluição e $n_{\text{CPZ}_L}(i)$ é o número de moles de CPZ na fase lipídica por injeção.

A constante de partição é obtida tendo em conta o número de moles de CPZ na fase aquosa CPZ_W e o número de moles de CPZ na fase lipídica CPZ_L :



No caso do **modelo de partição simples**, o coeficiente de partição observado é dado pela equação 14:

$$K_p^{obs} = \frac{n_{CPZ_L}/V_L}{n_{CPZ_W}/V_W} = \frac{n_{CPZ_L}/([L]\bar{V}_L V_T)}{n_{CPZ_W}/V_T} \quad (14)$$

e o número de moles de CPZ na membrana pode ser calculado pela equação (15)

$$n_{CPZ_L} = n_{CPZ_T} \frac{K_p^{obs}[L]\bar{V}_L}{1 + K_p^{obs}[L]\bar{V}_L} \quad (15)$$

onde n_{CPZ_T} é o número total de moles de CPZ, n_{CPZ_W} é o número de moles de CPZ na fase aquosa e n_{CPZ_L} é o número de moles de CPZ na fase lipídica. V_T é o volume total V_W o volume molar da fase aquosa, V_L volume molar da fase lipídica.

A concentração de lípido na célula pode ser calculada de acordo com a expressão (16)

$$[L]^*(i) = [L]^*(i-1) \left\{ 1 - \frac{V(i)}{V_{cell}} \right\} + \gamma \left\{ [L]^{Syr} \frac{V(i)}{V_{cell}} \right\} \quad (16)$$

Foi então necessário considerar a concentração de lípido acessível à CPZ. Consideraram-se dois valores, $\gamma=0.5$ (só a bicamada externa é acessível) e $\gamma=1$ (considerando acessibilidades às duas bicamadas).

Quando queremos considerar os efeitos eletrostáticos e corrigi-los nos cálculos de partição, temos de considerar que o coeficiente de partição observado, K_p^{obs} , se relaciona com o coeficiente de partição intrínseca (corrigido quanto aos efeitos eletrostáticos) através do potencial electrostático na superfície da bicamada Ψ_0 [43,44,45] de acordo com a equação 17.

$$K_p^{obs} = K_p e^{\frac{-zF\Psi_0}{RT}} \quad (17)$$

A densidade de carga da bicamada σ está relacionada com o potencial electrostático na superfície (equação 18) e pode ser calculada a partir da densidade superficial de moléculas carregadas na bicamada (equação 19). A diferença entre os valores de σ para as duas abordagens é minimizada pela alteração dos valores do

potencial de superfície e do coeficiente de partição intrínseca, o que permite o cálculo do melhor valor para esses dois parâmetros.

$$\sigma = \frac{\Psi_0}{|\Psi_0|} \sqrt{2000 \varepsilon R T \sum_i C_i (e^{-Z_i F \Psi_0 / RT} - 1)} \quad (18)$$

$$\sigma = e_0 \frac{\sum Z_i (n_i / n_L)}{\sum A_j (n_j / n_L)} \quad (19)$$

Onde ε é a constante dielétrica, R a constante dos gases ideais, F a constante de Faraday, C_i a concentração das espécies carregadas com carga z e e_0 como a carga electrostática elementar. A_j é a área da superfície do componente j da bicamada lipídica. Os parâmetros n_j e n_L são os números de moles da membrana do componente j e número de moles de lípido, respetivamente. A carga de CPZ inserida nas bicamadas lipídicas a pH = 7.46 pode ser calculada considerando o seu pKa = 8,3, tendo-se obtido o valor de 0,89. ^[46] A constante de partição intrínseca foi calculada com a folha de cálculo do Prof. Sandro Keller.

No estudo da partição de drogas para membranas, foram feitas titulações usando os sistemas lipídicos DMPC, DMPC: POPS (9:1), tendo sido testadas as concentrações 10 e 5 mM. O fármaco usado foi a CPZ, com concentração de 5 μ M em todos os ensaios. O número de injeções variou entre 20 e 25 e os volumes de injeções usados foram de 2 μ L na primeira injeção e 10 μ L nas restantes. O volume efetivo da célula do calorímetro usado é de 1.4323 mL. Todas as experiências foram realizadas a 37 °C.

2.3. Espectroscopia de Ultravioleta Visível UV-Vis

Foi estabelecido e testado um protocolo que permite a determinação da temperatura de transição de fase dos lipossomas por espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis), dada a diferença de dispersão ótica que se verifica quando os lipossomas estão na fase gel ou na fase cristal líquido. O espectro de absorção das amostras foi recolhido entre 220-400 nm, a temperaturas discretas, abrangendo um intervalo de temperaturas de cerca de ± 10 °C em torno da temperatura de transição esperada. Com o intuito de estabelecer o melhor arranjo experimental para estas determinações foram usados três tipos de células de quartzo, duas em forma de Y, uma transparente e outra negra, e uma célula transparente comum de 3mL (figura 21).

As temperaturas foram controladas através de um banho termostático conectado com o suporte da célula do espectrofotómetro. Os valores corretos da temperatura real na célula foram obtidos por calibração em experiências separadas, usando uma sonda de temperatura (VWR TD 110 High Precision Thermometer) inserida na célula com volume de tampão igual ao usado nos ensaios subsequentes. No caso da célula negra não foram realizadas calibrações porque dado o seu reduzido volume o sensor não entrava na célula, tendo-se utilizado os valores obtidos através da calibração da célula em forma de Y transparente.

Para a calibração de temperaturas o banho era colocado a uma dada temperatura e iniciava-se a contagem do tempo, registando-se para cada temperatura qual o tempo necessário para obter uma leitura de temperatura estável no sensor de temperatura, sendo esta temperatura e respetivo tempo de espera e a temperatura do banho registados. Isto foi feito para todas as temperaturas, usando-se intervalos mais largos (2°C) para as gamas de temperatura mais afastadas da temperatura de transição, antes e depois, e intervalos de temperatura mais estreitos ($0,3^{\circ}\text{C}$) em volta da temperatura de transição, para permitir uma boa cobertura desta, e assim uma determinação posterior mais exata da temperatura de transição. As mesmas temperaturas, tempos de espera e volume de solução foram usados nos ensaios com lipossomas.



Figura 21. Células usadas (a), Setup usado nas calibrações de temperatura (b)

Traçados os espectros é escolhido um comprimento de onda onde se verifique uma maior diferença na dispersão ótica entre a fase gel e a fase de cristal líquido.

Escolhido o comprimento de onda é traçada a curva da dispersão ótica OD em função da temperatura corrigida (obtida nos ensaios de calibração de temperatura) nesse comprimento de onda. A curva obtida é do tipo sigmoidal e foi por isso ajustada uma curva deste tipo aos pontos experimentais. A temperatura de transição T_m é o ponto de inflexão, que é determinada a partir da primeira e segundas derivadas da curva ajustada.

Nas experiências foram usados os sistemas lipídicos DMPC, DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1). Para o sistema DMPC, foram usadas a célula Y transparente e a célula grande, com os sistemas DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1) foi usada uma célula Y negra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

-
1. Tamanhos dos lipossomas
 2. Calorimetria Diferencial de Varrimento
 3. Calorimetria de Titulação Isotérmica
 4. Espectroscopia Ultravioleta Visível UV-VIS

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Tamanho dos lipossomas

A distribuição de tamanhos das vesículas unilamelares (LUVs) obtidas após extrusão foi determinada no aparelho Nano ZS (Malvern Instruments). Na figura 22 está um exemplo representativo de um resultado obtido para uma amostra de LUVs de DMPC. O diâmetro considerado para esta amostra foi o dado pelo valor de z-average, baseado na distribuição por intensidade, 113.6 nm, com um índice de polidispersidade de 0,127. No caso do sistema lipídico DMPC:POPS(8:2) e DMPC:POPS(9:1) os tamanhos obtidos foram de 117,5 nm com um índice médio de polidispersão de 0,08 e 126,1 com um índice de polidispersão de 0,03, respetivamente.

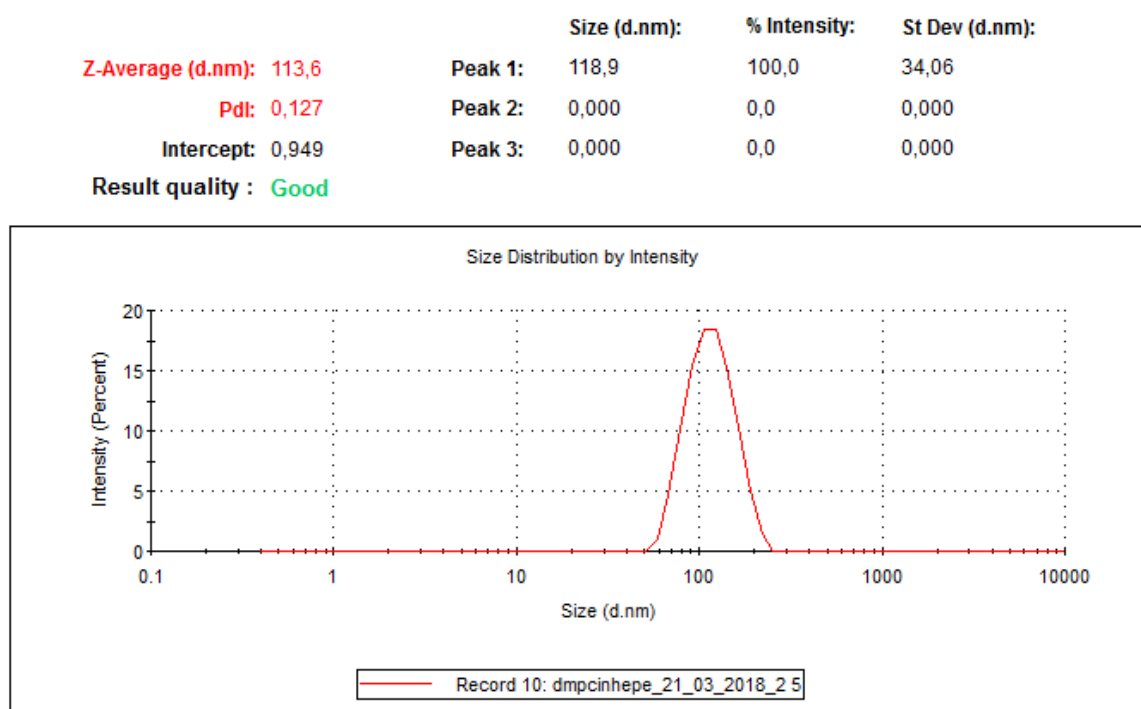


Figura 22. Resultados obtidos para a distribuição de tamanhos

2. Calorimetria diferencial de varrimento

2.1. Caracterização dos lipossomas por DSC

Foram realizados ensaios com os diferentes sistemas lipídicos. Seguidamente serão apresentados exemplos dos resultados obtidos para cada sistema lipídico.

2.1.1. Lipossomas de DMPC e POPS

Foram feitos ensaios com lipossomas de DMPC e de POPS, ambos de concentração cerca de 3mM (depois determinada rigorosamente). Na figura 23 está representado o termograma obtido para os LUVs do DMPC, e para os MLVs do POPS. No caso do POPS foram usados MLVs pois com LUVs não é possível obter-se um bom termograma, dado que a transição é mais larga do que com MLVs, e o calorímetro não vai a temperaturas suficientemente baixas para que tenhamos uma boa linha de base antes da transição.

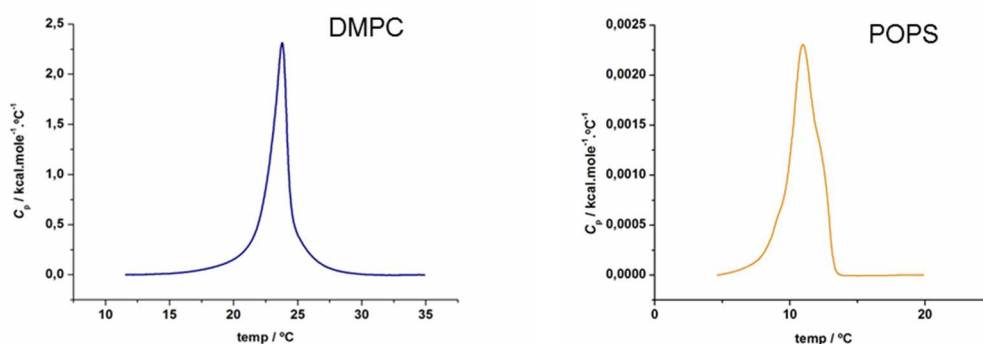


Figura 23. Termograma da transição gel-cristal líquido de LUVs de DMPC e MLVs de POPS

Os parâmetros termodinâmicos, temperatura de transição de fase T_m e a variação de entalpia de transição obtidos para os dois sistemas puros estão representados na tabela 2. Os valores da temperatura de transição (T_m) estão de acordo com valores da literatura, $24,6 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $25,3 \pm 0,3^\circ\text{C}$ para o DMPC [47,48] e 10°C no caso do POPS.[49] Relativamente à entalpia, no caso do DMPC os valores agora obtidos estão um pouco fora do intervalo de alguns valores publicados $26,8 \pm 0,3$ e $23,8 \pm 0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$. [47,48] No entanto, as condições experimentais não eram

exatamente as mesmas, em particular a força iónica do tampão, e no presente caso temos EDTA e azida no tampão.

Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos obtidos para os sistemas lipídicos puros

Sistema	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$
DMPC	24,0	20
	24,4	29
POPS	11,0	22
	11,1	20

Nota: as incertezas da temperatura são $\pm 0,5^\circ\text{C}$ e da entalpia $\pm 1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a mesma preparação e $\pm 3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para preparações diferentes.

2.1.2. Lipossomas de DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS(9:1)

Foram feitos ensaios com os sistemas lipídicos binários de DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1), também de concentração cerca de 3mM. Na figura 24 está representado o termograma obtido para os LUVs dos sistemas lipídicos binários referidos.

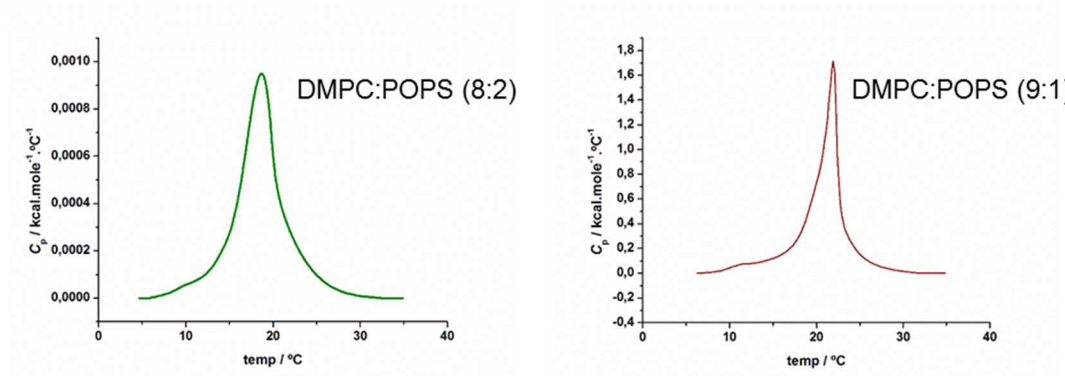


Figura 24. Termograma da transição gel-cristal líquido de LUVs de DMPC: POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1) em tampão HEPES

Os parâmetros termodinâmicos obtidos para os dois sistemas binários estão representados na tabela 3. O sistema lipídico DMPC:POPS (8:2) apresenta uma temperatura de transição menor do que a do DMPC:POPS (9:1). Esta diferença é de esperar uma vez que possui uma maior quantidade de POPS que apresenta uma menor temperatura de transição. Simultaneamente, como esperado, a transição do

DMPC:POPS (8:2) é mais larga do que a do DMPC:POPS (9:1), devido à diferença de estrutura dos dois lípidos, tornando-se a transição menos cooperativa.

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos obtidos para os sistemas binários DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1)

Sistema	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$
DMPC:POPS (8:2)	18,6	20
	18,7	20
DMPC:POPS (9:1)	24,7	29
	21,9	26

Nota: as incertezas da temperatura são $\pm 0,5^\circ\text{C}$ e da entalpia $\pm 1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a mesma preparação e $\pm 3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para preparações diferentes.

2.2. Efeito da CPZ nas membranas

No estudo do efeito da CPZ nas membranas lipídicas foram usados os sistemas lipídicos DMPC, DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1). Foram feitos ensaios para diferentes proporções de mistura lípido:CPZ. As proporções das misturas lípido:CPZ usadas foram, aproximadamente 30:1, 20:1 e 10:1.

2.2.1. Sistema lipídico: DMPC

Na figura 25 estão representados os termogramas obtidos no estudo do efeito da CPZ nas membranas de DMPC.

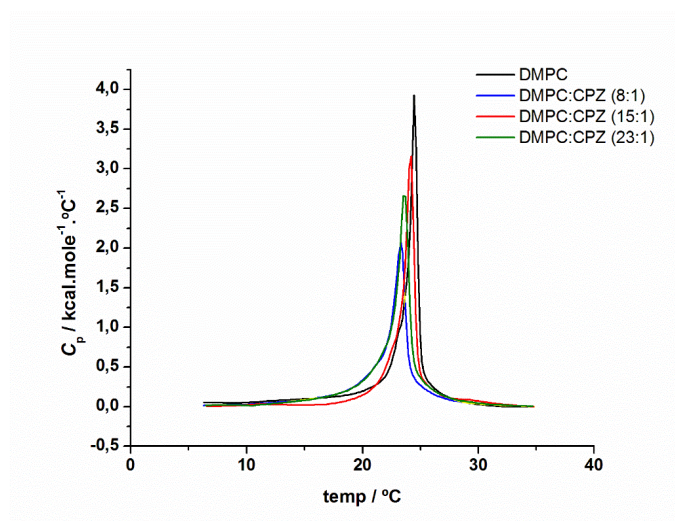


Figura 25. Termograma da transição gel-cristal líquido de LUVs DMPC na presença de diferentes proporções de CPZ

Os parâmetros termodinâmicos obtidos estão apresentados na tabela 4. A adição de CPZ traduz-se num aumento da entalpia de transição, que varia pouco com a proporção de CPZ, e numa variação pequena e não sistemática da temperatura de transição.

Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos obtidos no estudo do efeito da CPZ nas membranas de DMPC

Mistura	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$
DMPC	24,4	29
L:CPZ (23:1)	23,6	33
L:CPZ (15:1)	24,1	32
L:CPZ (8:1)	23,3	36

Nota: as incertezas da temperatura são $\pm 0,5^\circ\text{C}$ e da entalpia $\pm 1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

2.2.2. Sistema lipídico: DMPC:POPS (8:2)

Na figura 26 está representado o gráfico do efeito da CPZ em diferentes proporções lípido/CPZ nas membranas de DMPC:POPS (8:2).

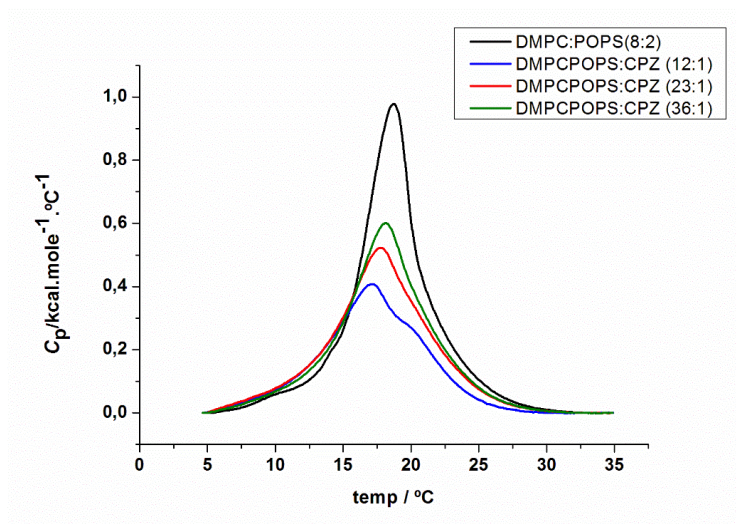


Figura 26. Termograma da transição gel-cristal líquido de LUVs DMPC:POPS(8:2) na presença de diferentes proporções de CPZ

Analisando os parâmetros termodinâmicos obtidos (tabela 5) verificou-se neste caso, que à medida que a proporção de CPZ aumenta, a temperatura de transição e a

variação da entalpia diminuem. Globalmente, apesar de tudo, a variação não é demasiado significativa, indicando que não há uma perturbação excessiva da membrana mista, mas a perturbação é bastante superior à verificada com o DMPC. Isto é de esperar, dado que temos agora o POPS, de carga negativa, e a CPZ tem carga positiva a este pH (carga +0,89). É de notar que neste caso não se atinge a neutralização de carga superficial, dado que a membrana tem 20% de carga negativa. Assim, os efeitos de perturbação são mais suaves, possivelmente seriam necessárias proporções ainda maiores de CPZ para chegar a haver neutralização das cargas.

Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos obtidos no estudo do efeito da CPZ nas membranas de DMPC:POPS (8:2)

Mistura	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$
DMPC:POPS (8:2)	18,7	20
L:CPZ (36:1)	18,1	19
L:CPZ (23:1)	17,6	19
L:CPZ (12:1)	17,1	18

Nota: as incertezas da temperatura são $\pm 0,5^\circ\text{C}$ e e da entalpia $\pm 1 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

2.2.3. Sistema lipídico: DMPC:POPS (9:1)

Na figura 27 pode-se ver o efeito da CPZ em diferentes proporções lípido/CPZ nas membranas de DMPC:POPS (9:1)

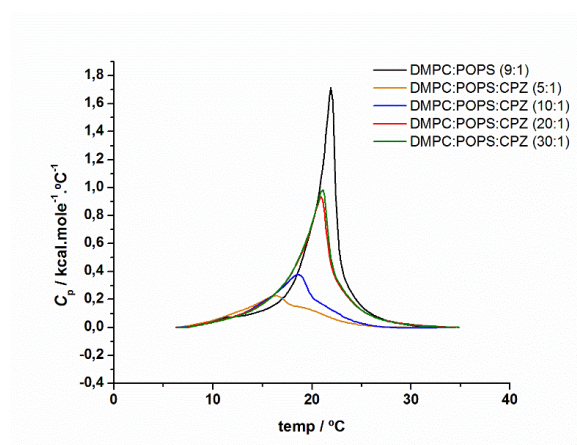


Figura 27. Termograma da transição gel-cristal líquido de LUVs DMPC:POPS(9:1) na presença de diferentes proporções de CPZ

Desde logo se destaca que há dois tipos de comportamento, um para as proporções 30:1 e 20:1, em que a perturbação é pequena, e uma grande perturbação para as duas outras misturas, mais ricas em CPZ.

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos obtidos no estudo do efeito da CPZ nas membranas de DMPC:POPS (9:1)

Mistura	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$
DMPC:POPS (9:1)	21,9	26
L:CPZ (30:1)	21,1	25
L:CPZ (20:1)	21,0	26
L:CPZ (10:1)	18,6	16
L:CPZ (5:1)	16,4	16

Analisando os parâmetros termodinâmicos obtidos (tabela 6) verificou-se que nas proporções mais baixas de CPZ a temperatura e a entalpia pouco variam, como já se antecipava por inspeção visual. Em contrapartida para as concentrações mais elevadas de CPZ verifica-se uma diminuição significativa tanto na temperatura de transição como na variação da entalpia. É de notar que para a proporção 10:1 estamos perto da neutralização de carga da membrana, e para a proporção seguinte 5:1, já estamos seguramente com excesso de carga positiva. Este sistema lipídico, possui 10% de carga negativa, enquanto que o sistema anterior possui mais carga negativa, e por isso nas proporções testadas no caso do sistema lipídico DMPC:POPS (8:2) a neutralização de carga não foi atingida.

Em conclusão, podemos afirmar que a CPZ provoca um efeito muito maior na membrana quando existe carga negativa, e esse efeito é particularmente drástico quando nos aproximamos ou ultrapassamos a neutralização de carga na membrana.

3. Calorimetria de titulação isotérmica

3.1. Partição da CPZ para as membranas

Foram feitos ensaios de ITC com os sistemas lipídicos DMPC, e DMPC:POPS (9:1) para estudo da partição da CPZ para as membranas. Como referido anteriormente, foi usado o protocolo de '*uptake*', em que a suspensão de lipossomas é colocada na seringa (5 mM) e titulada na solução de CPZ que está na célula (5 μ M). Para o tratamento dos resultados foram usadas duas folhas Excel como explicado em II Parte Experimental secção 2.2.2.

Os parâmetros termodinâmicos associados, a constante de partição (K_p) e a variação de entalpia (ΔH) para o processo de interação CPZ/membrana foram obtidos usando dois modelos, modelo de partição simples e com correção para os efeitos eletrostáticos. De seguida serão apresentados os resultados obtidos através dos dois modelos, apresentando-se apenas exemplos gráficos de cada situação. No cálculo da constante de partição (K_p) e da variação de entalpia (ΔH), foram usados dois valores de γ , como referido atrás 0,5 em que se considera que apenas a bicamada externa está acessível à CPZ e 1, em que é considerando que as duas bicamadas estão acessíveis à CPZ. Foi ainda feito um teste aos valores da fração de lípido acessível em que, para uma dada experiência, foram feitas minimizações para diferentes valores de γ fixos, desde 0,3 a 1, e compararam-se os resíduos obtidos em cada caso após minimização. Verificou-se que os valores do $\sum \Delta^2 Q$ diminuem sempre de 0,3 para 1 sendo assim possível que a esta temperatura toda a bicamada esteja acessível.

3.1.1. Sistemas lipídicos : DMPC e DMPC:POPS(9:1)

Na figura 28 está representado o termograma obtido na titulação de DMPC em CPZ, em que a azul (esquerda) estão representados os picos correspondentes a cada

injeção. Os picos foram integrados e obtém-se o valor do calor envolvido em cada injeção representado na figura a vermelho.

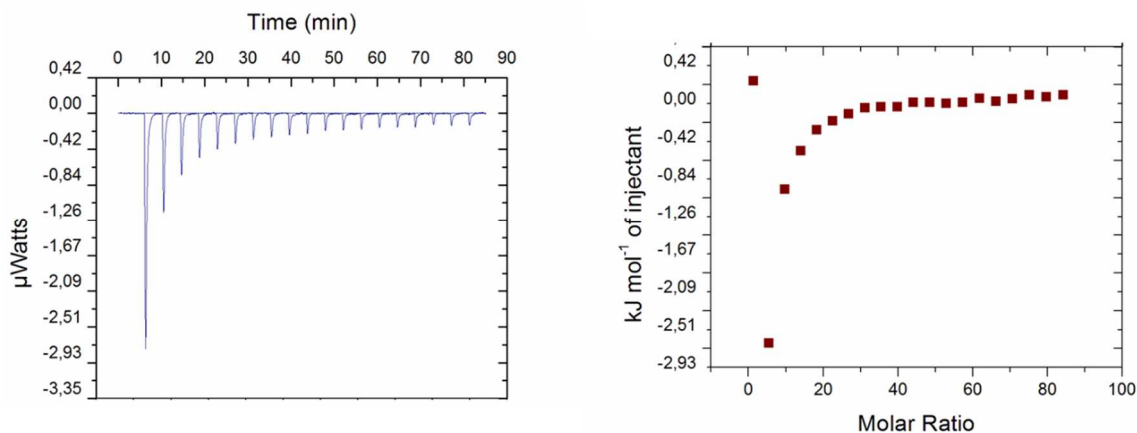


Figura 28. Termograma (esquerda) e correspondentes valores da variação de entalpia por injeção, relativos à titulação de CPZ com DMPC a 37 °C

Na figura 29 está representada a sobreposição de valores obtidos para o calor envolvido em cada injeção para todos os ensaios com cada um dos sistemas DMPC e DMPC:POPS (9:1). Pode observar-se muito boa concordância entre os valores obtidos nos vários ensaios.

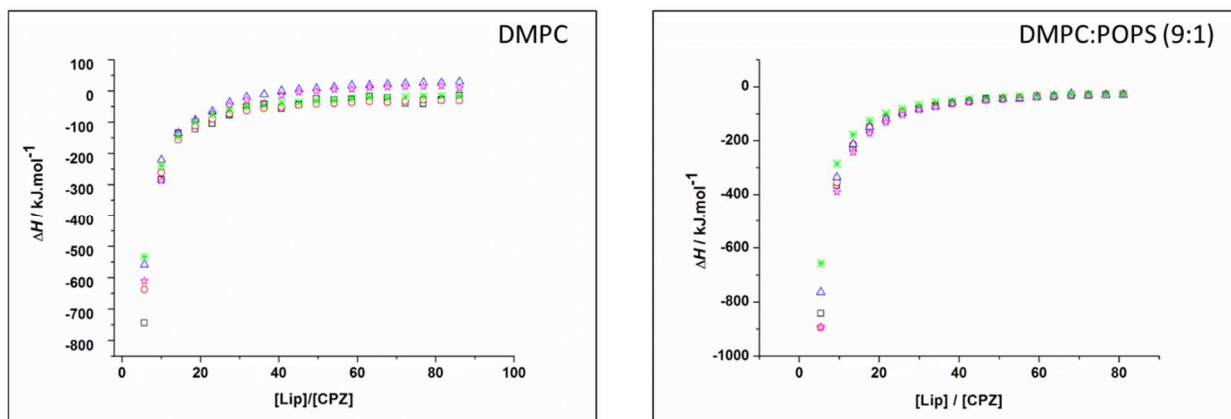


Figura 29. Gráfico da sobreposição das integrações feitas para o calor obtido nos ensaios usando DMPC e DMPC:POPS (9:1)

Passando à análise dos resultados, na figura 30 estão representados os gráficos obtidos considerando o modelo de partição simples para o sistema lipídico DMPC. A azul estão representados os valores obtidos experimentalmente e a laranja os valores obtidos por regressão não linear, considerando o gama fixo a 0,5 e a 1.

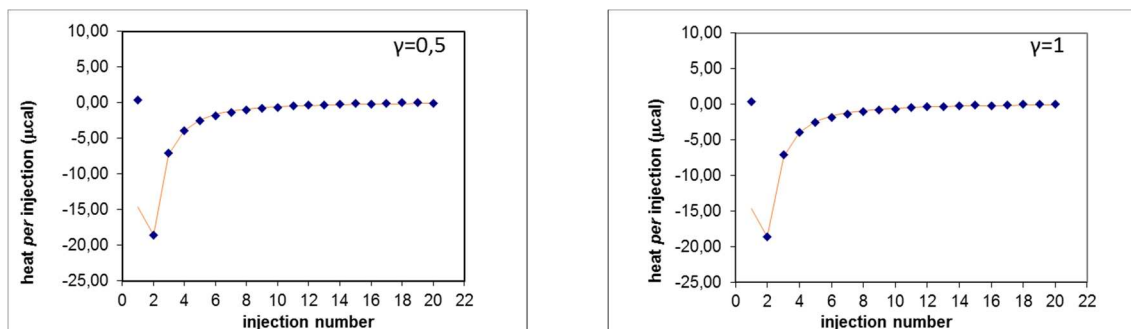


Figura 30. Representação gráfica da variação de entalpia por injeção em função do número da injeção para os ensaios de titulação de CPZ com DMPC com a curva calculada obtida considerando o modelo de partição simples, para $\gamma=0,5$ (esquerda) e $\gamma=1$ (direita)

Na figura 31 estão representados os gráficos obtidos considerando o modelo de partição com correção para os efeitos eletrostáticos do sistema lipídico DMPC. Os círculos a azul representam os valores calculados e os círculos a vermelho os valores experimentais. São representados os dois casos, o cálculo foi feito para valores de gama fixo em 0,5 e a 1.

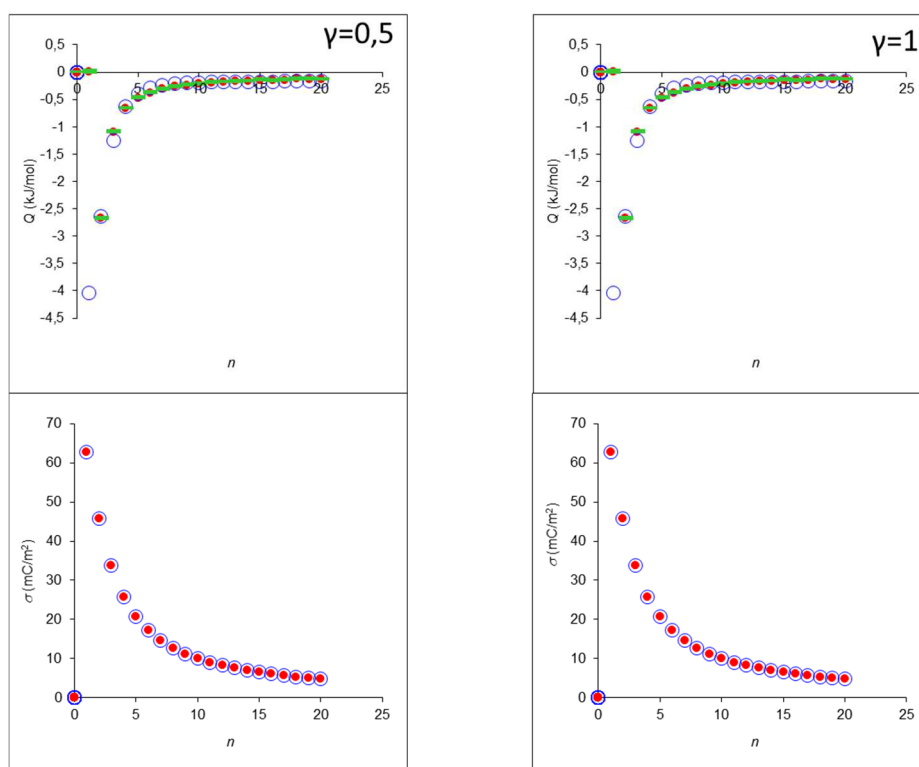


Figura 31. Gráficos do calor envolvido em cada injeção considerando o modelo de partição com correção dos efeitos eletrostáticos

Todos os resultados obtidos para os dois sistemas lipídicos estudados foram analisados individualmente com dois modelos, e em cada um dos modelos para $\gamma=0,5$ e $\gamma=1$ (fixos).

Note-se que o valor da constante de partição do modelo simples como apresentado em II Parte Experimental secção (2.2.2) é adimensional. Assim, para permitir a comparação com o valor obtido quando se usa o modelo com correção para os efeitos eletrostáticos, em $(\text{mol. dm}^{-3})^{-1}$, fez-se a seguinte transformação

$$K_{p(\text{obs})} / (\text{mol. dm}^{-3})^{-1} = K_{p(\text{obs})} (\text{adimensional}) * V_L$$

em que V_L é o volume molar do lípido, tendo sido usado o valor de $0,795 \text{ dm}^3.\text{mol}^{-1}$.

Na tabela 7 podem ver-se os valores médios e respetivo desvio padrão obtidos (5 ensaios em todos os casos), para cada sistema lipídico e cada um dos modelos de partição, simples e com correção dos efeitos eletrostáticos, em cada caso para $\gamma=0,5$ e gama $\gamma=1$.

Tabela 7. Valores médios e respetivo desvio padrão da constante de partição e respetiva variação de entalpia de partição que foram obtidos usando o modelo de partição simples e partição com correção dos efeitos eletrostáticos para a partição de CPZ nas diferentes membranas estudadas, considerando só o folheto externo ($\gamma=0,5$) e todo o lípido presente ($\gamma=1$)

Modelo de partição Simples					Modelo com correção dos efeitos eletrostáticos			
Sistema	$\gamma = 0,5$		$\gamma = 1$		$\gamma = 0,5$		$\gamma = 1$	
	$K_p^{obs} / \text{M}^{-1}$	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$	$K_p^{obs} / \text{M}^{-1}$	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$	K_p / M^{-1}	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$	K_p / M^{-1}	$\Delta H / (\text{kJ/mol})$
DMPC	$(8,1 \pm 0,2) \times 10^4$	-36 ± 4	$(4,1 \pm 0,8) \times 10^4$	-36 ± 4	$(3,8 \pm 3,0) \times 10^5$	-28 ± 4	$(8,4 \pm 5,0) \times 10^4$	-31 ± 4
DMPC:POPS (9:1)	$(7,96 \pm 0,08) \times 10^4$	-44 ± 3	$(4,0 \pm 0,5) \times 10^4$	-46 ± 3	$(2,7 \pm 0,9) \times 10^5$	-35 ± 3	$(5,6 \pm 2,0) \times 10^4$	-38 ± 2

Verifica-se que para ambos os modelos quando se passa do sistema lipídico de DMPC para a mistura binária de DMPC:POPS (9:1) em que 10% da carga é negativa o valor da variação de entalpia se torna significativamente mais negativo, enquanto que a constante de partição é igual no modelo de partição simples e pareceria indicar uma diminuição no caso do modelo com correção do efeito eletrostático, mas os intervalos de erro cruzam-se, por isso os valores também aqui não são significativamente diferentes.

Comparando os valores de K_p obtidos nos dois modelos, verifica-se que o valor obtido para $\gamma=1$ é muito mais pequeno que o obtido para $\gamma=0,5$, como teria de ser

(folheto externo ou os dois folhetos) – é exatamente metade no caso da partição simples e cerca de $\frac{1}{4}$ no caso do modelo com correção dos efeitos eletrostáticos.

Os valores agora obtidos podem ser comparados com valores da literatura para a partição da CPZ para outros sistemas lipídicos, nomeadamente POPC e POPC:POPS 9:1, também à temperatura de 37 °C. Os valores reportados ^[50] encontram-se na tabela 8, para o modelo de partição simples e modelo com correção dos efeitos eletrostáticos, em ambos os casos apenas para $\gamma = 0,5$ (só são reportados para este valor).

Tabela 8. Valores de literatura obtidos usando o modelo de partição simples e partição com correção dos efeitos eletrostáticos para a partição de CPZ em membranas de POPC e POPC:POPS(8:2)

Modelo de partição Simples			Modelo com correção dos efeitos eletrostáticos	
Sistema	$\gamma = 0,5$		$\gamma = 0,5$	
	$K_p^{obs} \text{ M}^{-1}$	$\Delta H/ \text{ (kJ/mol)}$	$K_p \text{ M}^{-1}$	$\Delta H/ \text{ (kJ/mol)}$
POPC	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^4$	-14 ± 1	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^4$	-13 ± 1
POPC:POPS (9:1)	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^4$	-28 ± 6	$(7,2 \pm 0,2) \times 10^3$	-27 ± 3

Comparando os valores agora obtidos com os da literatura representados na tabela 8, para o modelo de partição com correção dos efeitos eletrostáticos e $\gamma = 0,5$ verifica-se que os valores de entalpia são significativamente mais negativos nos sistemas com DMPC do que nos sistemas com POPC. Os valores da constante de partição, por seu turno, são significativamente mais elevados nos sistemas com DMPC do que nos sistemas com POPC, qualquer que seja o modelo usado para os determinar.

Pode assim concluir-se que o efeito do lípido zwitteriónico na partição é muito significativo, tanto a nível entálpico como na partição, dado que o lípido negativo foi o mesmo nos dois estudos.

4. Espectroscopia de Ultravioleta Visível UV-VIS

Foram obtidos espectros das suspensões lipídicas de DMPC com a célula Y transparente e a célula grande, e de DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1) com a célula Y negra. Como dito anteriormente, foi feita a calibração de temperaturas usando um banho termoestabilizado e uma sonda de temperatura inserida na célula. Foram registadas a temperatura do banho, a temperatura do sensor e o tempo de espera necessário para obter uma leitura de temperatura estável no sensor de temperatura (tabela 9).

Tabela 9. Resultados da calibração das temperaturas usadas para o DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1)

Temperatura do banho (°C)	Temperatura na célula (°C)	Tempo (min)
10,0	10,6	15
12,0	12,2	10
14,0	14,3	8
16,0	16,3	8
16,3	16,5	5
16,6	16,8	5
16,9	17,1	5
17,2	17,4	5
17,4	17,7	5
17,7	18,0	5
18,1	18,3	5
18,4	18,6	5
18,7	18,9	5
19,0	19,2	5
19,3	19,5	5
19,6	19,8	6
19,9	20,0	6
20,2	20,3	6

20,5	20,6	6
20,8	20,9	6
21,1	21,2	6
21,4	21,5	6
21,7	21,8	6
22,0	22,1	6
22,3	22,4	6
22,6	22,7	6
22,9	23,0	6
25,0	24,9	6
27,0	26,8	6
29,0	28,8	7
31,0	30,7	7

Depois de traçados os espectros foi escolhido um comprimento de onda onde se verificou maior diferença na dispersão ótica. Escolhido o comprimento de onda, foi traçada uma curva da dispersão ótica OD em função da temperatura corrigida. Foram traçadas curvas a diferentes comprimentos de onda, no entanto para consistência e comparabilidade de todas as experiências, são reportados os valores para o comprimento de onda de 260nm em todos os casos.

Foi obtida uma curva do tipo sigmoidal, e foi feito um ajuste com uma curva deste tipo aos pontos experimentais. A temperatura de transição T_m considerada corresponde ao ponto de inflexão da curva obtida e foi determinada a partir da primeira e segundas derivadas da curva ajustada, usando o programa *Origin*. Aqui apenas se apresenta um exemplo para cada sistema lipídico.

4.1. Experiências com DMPC

Nos ensaios com DMPC, usando a célula Y transparente foi obtido o espectro representado na figura 32. Foi usado um intervalo de temperatura de 10 a 31°C, de modo a incluir a zona de transição de fase do DMPC, cujo valor de temperatura de transição de fase T_m é de ~24°C.

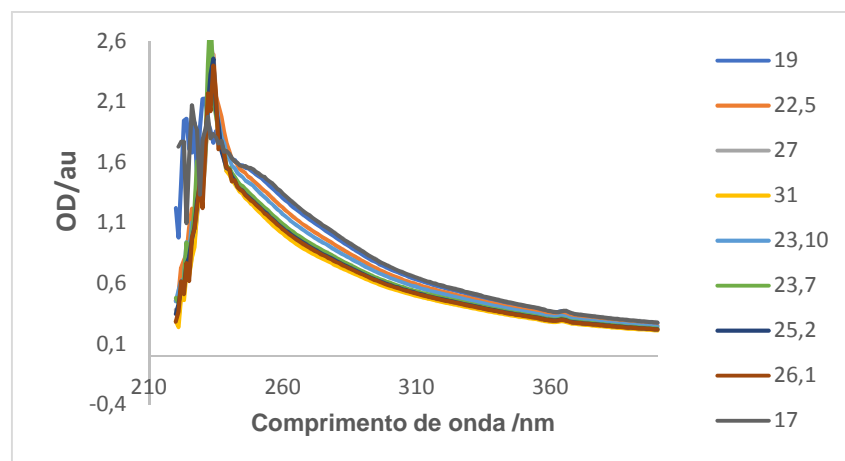


Figura 32. Espectro do DMPC célula Y(220-400nm)

Como dito anteriormente, o valor de comprimento de onda escolhido foi de 260nm. A esse mesmo comprimento de onda foi traçada a curva de OD em função da temperatura e foi feito um ajuste com uma curva também do tipo sigmoidal aos pontos experimentais. A curva obtida com ajuste feito está representada na figura 33.

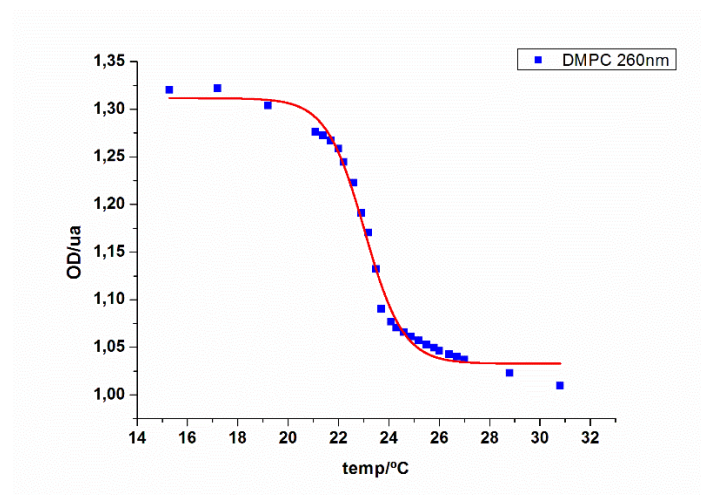


Figura 33. Curva de OD em função da temperatura

Após o ajuste da curva, foram traçadas a primeira e segundas derivadas representadas na figura 34. O mínimo da curva da primeira derivada corresponde à T_m de transição da primeira derivada. Na curva da segunda derivada, a T_m é dada pelo ponto em que a curva passa por zero.

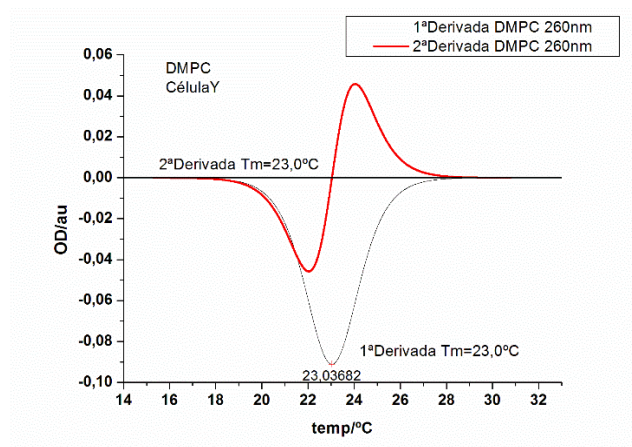


Figura 34. Representação gráfica da primeira e segundas derivadas da curva ajustada

Na tabela 10, estão representados os valores obtidos nas experiências com DMPC usando as duas células, em Y transparente e a célula grande. O valor da temperatura de transição obtido por DSC é também apresentado. Como se pode ver na tabela, foi obtido um bom acordo nos valores obtidos pelas duas técnicas.

Tabela 10. Valores obtidos para as temperaturas de transição (T_m) do DMPC

Célula	Sistema	T_m 1ª Derivada	T_m 2ª Derivada	T_m DSC
Y	DMPC	23,0	23,0	23,9
Y		23,0	23,0	
Grande		23,6	23,6	
Grande		23,5	23,5	

4.2. Experiências com DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1)

Os espectros obtidos para estes dois sistemas foram idênticos aos obtidos para o DMPC, assim como as curvas da dispersão ótica em função da temperatura.

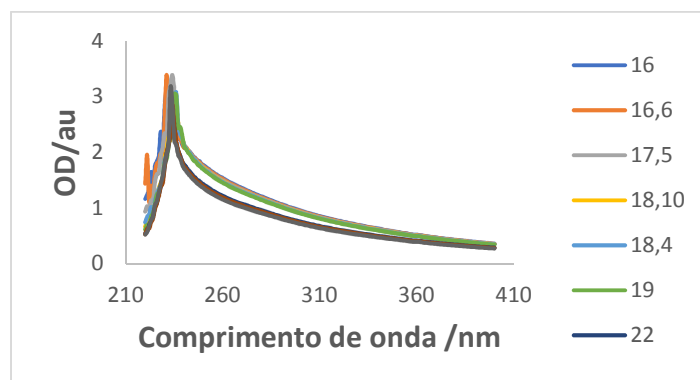


Figura 35. Espectro do DMPC:POPS (9:1) usando a célula Y negra (220-400nm)

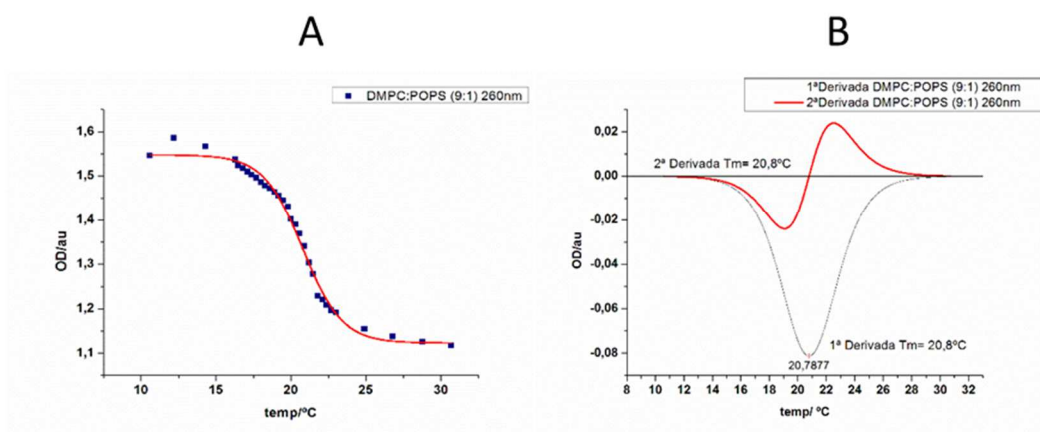


Figura 36. Curva de OD em função da temperatura (A) e gráfico das derivadas para o sistema DMPC:POPS (9:1) (B)

Na figura 36 esta representada a curva obtida nas experiências usando o sistema lipídico DMPC:POPS (9:1) e também o gráfico da primeira e segundas derivadas. Após tratamento dos resultados foram obtidos os valores de temperaturas de transição T_m representados na tabela 11.

Tabela 11. Valores obtidos para as temperaturas de transição (T_m) do DMPC:POPS (8:2) e DMPC:POPS (9:1)

Célula	Sistema	T_m 1ª Derivada	T_m 2ª Derivada	T_m DSC
Y Negra	DMPC:POPS (8:2)	18,8	18,8	19,6
		18,3	18,3	18,6
		17,8	17,8	18,6
	DMPC:POPS (9:1)	20,8	20,8	22,0
		20,8	20,8	
		20,7	20,7	

Os valores obtidos para o DMPC:POPS (8:2) apresentam um bom acordo numa das experiências e um acordo razoável noutras duas com os obtidos por DSC, enquanto que no caso do DMPC:POPS (9:1) a temperatura obtida por espectroscopia é muito consistente entre diferentes ensaios, mas significativamente mais baixa que a obtida por DSC. Não se encontrou explicação para as maiores discrepâncias dos valores encontrados entre as duas técnicas para os sistemas binários.

Em resumo, este protocolo funciona bem como método alternativo ao DSC na determinação da temperatura de transição de fase dos lipossomas de DMPC, fornecendo resultados apenas aproximados para os sistemas binários. Esta técnica tem de ser melhor explorada antes de poder ser adotada como alternativa ao DSC na determinação de temperaturas de transição para sistemas lipídicos binários.

CONCLUSÃO

IV. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por DSC indicam que a CPZ interage com as membranas, provocando uma perturbação no seu comportamento fásico, muito mais significativa na presença de carga negativa na membrana, o que se justifica dada a carga positiva da CPZ nas condições usadas. Quando se usam razões lípido/CPZ que ultrapassam a neutralização, a perturbação é muito marcada, com aparente segregação da membrana. A CPZ destabiliza a fase gel dos lipossomas, pois observa-se uma diminuição da temperatura de transição da fase gel para cristal líquido com o aumento da proporção de CPZ.

Os resultados de ITC confirmam a partição da CPZ para a membrana, confirmando uma partição mais extensa no caso das membranas com POPS. Os resultados obtidos sugerem que à temperatura estudada, 37°C, possivelmente há translocação da CPZ e toda a membrana estará envolvida. Esta hipótese tem de ser confirmada por estudos cinéticos de avaliação da translocação.

Através da espectroscopia de ultravioleta visível foi possível estabelecer um protocolo que permitiu a determinação da temperatura de transição de fase dos lipossomas, verificando-se uma concordância excelente com os resultados obtidos através de DSC no caso do DMPC e razoável no caso dos sistemas binários. O estabelecimento deste protocolo permite assim o uso desta técnica para determinar a T_m dos lipossomas quando o DSC não está disponível.

REFERÊNCIAS

V.REFERÊNCIAS

- [1]. Loura, L. M. S., Almeida, R. F. M., **Tópicos de Biofísica de Membranas**; Lidel, Ed.; Lisboa, 2004.
- [2]. Mouritsen, O. G. **Life — as a Matter of Fat: The Emerging Science of Lipidomics**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.
- [3]. S.J. Singer, G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175 (1972) 720–313.
- [4]. W. Stillwell, **An Introduction to Biological Membranes: From Bilayers to Rafts**, Elsevier Science, 2013.
- [5]. Malinsky, J., Opekarová, M., Grossmann, G., Tanner, W. Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi, *Annu. Rev. Plant Biol.* 64 (2013) 501–29.
- [6]. Simons, K., Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1997) 569–72.
- [7]. Evans, D. F., Wennerström, H. **The Colloidal Domain – where physics, chemistry, biology and technology meet**, New York, VCH Publishers, 1994.
- [8]. Lipowsky, R. **Generic interactions of flexible membranes. Structure and Dynamics of membranes – generic and specific interactions**, Editors R. Lipowsky and E. Sackmann. Amsterdam, Elsevier, 1995.
- [9]. Fahy, E, Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H. Jr, Murphy, R. C., Raetz, C. R., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G, VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., Dennis, E. A. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipids Res.* 46 (2005). 839-862.
- [10]. Claude, L. **“Cyberlipid Center”** 2009, from www.cyberlipid.org.
- [11]. Sharma, A. Sharma, U.S., Liposome in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.* 154 (1997) 123-140.
- [12]. Vemuri, S., Rhodes, C.T., Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helvetiae*, 70 (1995). 95-111.
- [13]. Lasic D.D. In: **Liposomes: from physics to applications**. 1st ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherland, 1993.
- [14]. Norde, W. **Self-assembled structures. Colloids and interfaces in life sciences**. pp 183-207N. Willem, Ed.. New York Marcel Dekker, Inc., 2005.
- [15]. Ferreira, C.M. (2006). **Utilização de lipossomas como modelos de biomembranas na avaliação e quantificação da atividade de anti - inflamatórios**. Tese Doutorado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal
- [16]. Smith, E. A., Dea, P. K. **Differential scanning calorimetry studies of phospholipid membranes: The interdigitated gel phase**, pp 407–44 In “Applications of Calorimetry in a Wide Context Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry” Intech: Rijeka, Croatia, 2013.
- [17]. Gleeson, M. P., Hersey, A., Hannongbua, S., *Curr. Topics Med. Chem*, 11, (2011) 358-381.
- [18]. Attwood, D. The mode of association of amphiphilic drugs in aqueous solution. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 55 (1995) 271–303.
- [19]. White, S. H., Wimley, W. C., Ladokhin, A. S., Hristova, K. Protein folding in membranes: determining energetics of peptide-bilayer interactions. *Meth.Enzimol.* 295 (1998) 62-87.
- [20]. Matos, C., Lima, J. L., Reis, S., Lopes, A., Bastos, M. Interaction of antiinflammatory drugs with EPC liposomes: calorimetric study in a broad concentration range. *Biophys. J.* 86 (2004) 946–954.

- [21]. Mosior, M. McLaughlin, S. Peptides that mimic the pseudosubstrate region of protein kinase C bind to acidic lipids in membranes. *Biophys. J.* 60 (1991) 149-159.
- [22]. Leo, A., Hansch, C., Elkins, D. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* 71(1971) 525-616.
- [23]. Walz, Dieter, Teissié, Justin, Milazzo, Giulio (Eds.) **Bioelectrochemistry of membranes**, Springer, Birkhäuser (2004).
- [24]. Eyer, K., Paech, F., Schuler, F., Kuhn, P., Kissner, R., Belli, S., Dittrich, P. S., Krämer, S. D., *J. Control. Release* 173 (2014) 102–109.
- [25]. Gouy, M., "Sur la constitution de la charge électrique a la surface d'un electrolyte, *J. Phys. Theor. Appl.* 9 (1910) 457-468.
- [26]. Averyard, R. Haydon, D. A. **Electrical potencial at interfaces. An introduction to the principles of surface chemistry**. Cambridge University Press, Cambridge 31-57 (1973).
- [27]. Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T., McLaughlin, S. Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipid, *Biochemistry* 18 (1979) 5213-5223.
- [28]. Kim, J., Mosior, M., Chung, L. A., Wu, H., McLaughlin, S., Binding of peptides with basic residues to membrane containg acidic phospholipids, *Biophys. J.* 60 (1991) 135-148.
- [29]. Butt, H.-J., Graf, K., Kappl, M. **Physics and chemistry of interfaces**. Wiley-VCH, 2003.
- [30]. Wadsö, I., Goldberg R.N., Standards in isothermal microcalorimetry (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1625-1639.
- [31]. Hinz, H.J., Schwarz, F.P., Measurement and analysis of results obtained on biological substances with Differential Scanning Calorimetry (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 73(4) (2001) 745-759.
- [32]. Leharne, S.A., Chowdhry, B.Z. **Thermodynamic Background to Differential Scanning Calorimetry**. In "Biocalorimetry. Applications of calorimetry in the biological sciences", Ed. Ladbury, J.E., Chowdhry, B.Z., Jonh Wiley & Sons, Lda., England, 1997.
- [33]. Draczkowski, P., Matosiuk, D., Jozwiak, K. J., *Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 313–325.
- [34]. O'Brien, R., Chowdhry, B. Z., Ladbury, J. E. **Isothermal titration calorimetry of biomolecules**, Chapter 10, In "Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry", Edited by S. E. Harding and B. Z. Chowdhry. United Sates, Oxford University Press, 2001).
- [35]. Wiseman, T., Williston S., Brandts, J. F., Lin, L. N., "Rapid measurement of binding constants an heats of binding using a new titration calorimeter, *Anal. Biochem.* 179 (1989) 131-137.
- [36]. VP-ITC Microcalorimeter User´s Manual. Microcal, Northampton, MA, USA, 2005.
- [37]. Skoog, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. São Paulo, Bookman Companhia Editora Ltda, 6ª edição, 2009.
- [38]. New Roger, R. C. **Liposomes a practical approach**. New York, Oxford University Press, 1990.
- [39]. McClare, C. W.F. **An accurate and conveniente organic phosphorous assay** *Anal. Biochem.* 39 (1971) 527-530.
- [40]. Müller, A., Roy, S., En route from the mystery of molybdenum blue via related manipulatable building blocks to aspects of materials science, *Coord. Chem. Rev.* 245 (2003) 153-166.
- [41]. Keller, S., Vargas, C., Zhao, H., Piszczek, G., Brautigam, C. A., Schuck. P., High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis, *Anal.Chem.* 84 (2012) 5066-5073.

- [42]. Scheuermann, T. H., Brautigam, C. A. High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: New features of NITPIC, *Methods* 76 (2015) 87-98.
- [43]. Moreno, M. J., Bastos, M., Velazquez-Campoy, A., Partition of amphiphilic molecules to lipid bilayers by isothermal titration calorimetry, *Anal. Biochem.* 399 (2010) 44-47.
- [44]. Tan, A. M., Ziegler, A., Steinbauer, B., Seelig, J., Thermodynamics of sodium dodecylsulphate partitioning into lipid membranes, *Biophys. J.* 83 (2002) 1547-1556.
- [45]. Keller, S., Heerklotz, H., Jahnke, N., Blume, A., Thermodynamics of lipid membranes solubilisation by sodium dodecyl sulphate, *Biophys. J.* 90, (2006) 4509-4521.
- [46]. Kitamura, K., Takegami, S., Kobayashi, T., Makihara, K., Kotani, C., Kitade, T., Moriguchi, M., Inoue, Y., Hashimoto, T., Takeuchi, M., Dissociation constants of phenothiazine drugs incorporated in phosphatidylcholine bilayer of small unilamellar vesicles as determined by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometric titration, *Biochim. Biophys. Acta*, 1661 (2004) 61-67.
- [47]. Abrunhosa, F., Faria, S., Gomes, P., Tomaz, I., Pessoa, J. C., Andreu, D., Bastos, M. *J. Phys. Chem. B*, 109 (2005) 17311-17319.
- [48]. Bastos, M. Águas, A., **The use of DSC for characterization of thermotropic phase transitions in lipid bilayer membranes. The basics of liposome sample preparation and their DSC studies**, Application Note, Malvern, 2016.
- [49]. Jiménez-Monreal, A. M., Villalain, J., Aranda, F. J., Gómez-Fernández, J. C., The phase behavior of aqueous dispersions of unsaturated mixtures of diacylglycerols and phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1373 (1998) 209-219.
- [50]. Martins, P. T., Velazquez-Campoy, A., Vaz, W. L. C., Cardoso, R. M. S., Valério, J., Moreno, M. J., Kinetics and Thermodynamics of Chlorpromazine Interaction with Lipid Bilayers: Effect of Charge and Cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.* 134, (2012) 4184-4195.